

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios químicos y quimicofísicos sobre bacteriorodopsina
en su membrana natural y en modelos de membrana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Catalina Fernández Torrecillas

DIRECTOR:

Armando Albert Martínez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326702035

**ESTUDIOS QUIMICOS Y QUIMICOFISICOS SOBRE
BACTERIORODOPSINA EN SU MEMBRANA NATURAL
Y EN MODELOS DE MEMBRANA**

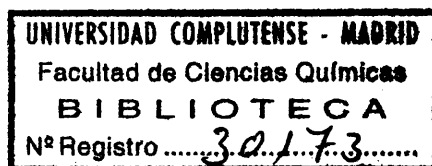
MEMORIA

para aspirar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

por

CATALINA FERNANDEZ TORRECILLAS



616361477

i38067584

INSTITUTO DE QUIMICA-FISICA «ROCASOLANO» (C.S.I.C.)

Madrid, Marzo 1977

El presente trabajo ha sido realizado en la Sección de Coloides del Instituto de Química Física "Rocasolano" (C.S.I.C.), durante los años 1.974 a 1.976, bajo la dirección del Profesor de Investigación Dr. D. Armando Albert Martínez jefe de dicha sección a quien expreso mi agradecimiento.

Especialmente, quiero hacer constar mi gratitud al Dr. D. José González Rodríguez, que proyectó e inició este estudio sobre proteínas - de membrana y durante su desarrollo supervisó su realización, así como a la Dra. D^a P. Usobiaga, a los doctores J.L. Sáiz, A.U. Acuña y J. Laynez, y a todos mis compañeros de laboratorio.

Del mismo modo agradezco a la dirección de este Instituto por las facilidades que en el mismo me han sido concedidas, y al P.F.P.I. la - ayuda económica aportada para la realización de este trabajo.

A la memoria de mi padre

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS MAS UTILIZADOS

SDS.-	Dodecil sulfato sódico.
DchNa.-	Desoxicolato sódico.
Clf.-	Clorofila.
Clfa.-	Clorofila a.
BCl.-	Bacterioclorofila.
P_{λ} .-	Centro fotorreactivo de una agrupación de clorofila.
H.H.-	Halobacterium halobium.
M.P.-	Membrana púrpura.
M.R.-	Membrana roja.
M.M.-	Membrana marrón.
B.R.-	Bacteriorodopsina.
BSA.-	Seroalbúmina bovina.
LYH.-	Lecitinas de yema de huevo.
λ .-	Longitud de onda.
ν .-	Frecuencia.
h .-	Constante de Plank.
$t_{1/2}$.-	Tiempo de semi-vida.
ϕ .-	Rendimiento cuántico.
Δp .-	Potencial químico por unidad de carga eléctrica.
$\Delta \psi$.-	Diferencia de potencial eléctrico.
DC.-	Dicroísmo circular.
ϵ .-	Coeficiente de extinción.

$c.m.c.-$	Concentración micelar crítica.
ϕ_2 y ϕ_2^* .-	Volumen específico parcial aparente.
ϕ_2^1 .-	Volumen específico parcial efectivo.
\bar{v}_2 .-	Volumen específico parcial verdadero de la proteína.
\bar{v}_D .-	Volumen específico parcial del detergente unido a la proteína.
\bar{v}^* .-	Volumen específico parcial de la micela <u>pro</u> teína-SDS.
δ_D .-	Gramos de SDS ligados por gramo de proteína.
ρ .-	Densidad de la disolución.
ρ_0 .-	Densidad del disolvente.
C_2 .-	Concentración de la proteína en disolución.
C_2^* .-	Concentración de la proteína con SDS ligado.
M_2 .-	Peso molecular verdadero de la proteína.
M_2^* .-	Peso molecular de la micela proteína-SDS.
M_{2app} .-	Peso molecular aparente.
f .-	Coefficiente de fricción.
η .-	Viscosidad del disolvente.
$[\eta]$.-	Viscosidad intrínseca.
s^0 .-	Coefficiente de sedimentación, extrapolado a concentración cero.
D^0 .-	Coefficiente de difusión, extrapolado a concentración cero.

I N D I C E

Página

CAPITULO I. INTRODUCCION, ANTECEDENTES Y PLAN TEAMIENTO.

1. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. ASPECTOS GENERALES DE INTERES EN EL ESTUDIO QUIMICO-FISICO DE LA ESTRU <u>C</u> TURA Y FUNCION DE MEMBRANAS DENTRO DE LA TEORIA DE LA DOBLE CAPA LIPI- DICA.....	1
1.2. MEMBRANAS BIOLOGICAS	10
1.2.1. <u>Membranas fotosensoras</u>	11
1.2.2. <u>Membranas fotosintéticas</u> ...	15
1.3. TRANSLOCACION VECTORIAL DE PROTONES COMO MECANISMO UNIVERSAL DE ACOPLA- MIENTO ENERGETICO ENTRE CADENAS DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES Y FOSFO RILIZACION OXIDATIVA Y FOTOFOSFORI- LIZACION.....	20
1.4. MODELOS DE MEMBRANA INCORPORANDO PROTEINAS DE MEMBRANAS NATURALES - RECONSTITUCION FUNCIONAL.....	24
2. <u>MEMBRANA PURPURA DE HALOBACTERIUM HALOBIUM:</u> <u>BACTERIORODOPSINA</u>	29
2.1. ANTECEDENTES HASTA 1.974.....	29
2.2. PROGRESO REALIZADO DESDE 1.974 HAS- TA LA ACTUALIDAD.....	38

2.2.1. <u>Estudios estructurales</u>	38
2.2.2. <u>Estudios funcionales</u>	45
2.3. ATRACTIVO DE MP DE H.H. COMO MATERIAL PARA ESTUDIOS QUIMICO-FISICOS	48
3. <u>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO DE LA PRESENTE TESIS</u>	50
3.1. OBJETIVOS.....	53
3.2. PLAN DE TRABAJO	54
4. <u>INVESTIGACIONES FUTURAS SOBRE EL TEMA</u> ..	56
5. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	58
CAPITULO II. <u>MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES</u>	
2.1. METODOS PREPARATIVOS DEL MATERIAL DE ESTUDIO.....	64
2.1.1. <u>Cultivo de H.H.</u>	64
2.1.1.1. Procedencia y tipo de cepas de H.H.....	64
2.1.1.2. Condiciones de cultivo ..	64
2.1.1.3. Medio de cultivo	66
2.1.1.4. Mantenimiento de cepas de H.H.....	67
2.1.2. <u>Fraccionamiento subcelular</u> .	67
2.1.2.1. Preparación de MP	68
2.1.2.2. Preparación de MM	70
2.1.2.3. Preparación de vesículas de H.H.	70

2.1.3. <u>Extracción de lípidos de MP</u> <u>y solubilización de BR en -</u> <u>soluciones acuosas mediante</u> <u>detergentes.....</u>	71
2.1.4. <u>Preparación de BR en agua..</u>	73
2.1.5. <u>Solubilización de MP en sol-</u> <u>ventes orgánicos</u>	73
2.1.6. <u>Preparación de lecitinas de</u> <u>yema de huevo.....</u>	74
2.1.7. <u>Preparación de liposomas...</u>	76
2.1.7.1. Liposomas de LYH	77
2.1.7.2. Liposomas de LYH + BR....	77
2.2. METODOS QUIMICOS.....	78
2.2.1. <u>Determinación de proteína..</u>	78
2.2.2. <u>Determinación de fósforo...</u>	78
2.2.3. <u>Determinación de retinal...</u>	79
2.2.4. <u>Solubilización de membrana</u> <u>púrpura (MP) en tampón TRIS-</u> <u>ClH 0,1 M, pH = 7,7, con de-</u> <u>tergentes.....</u>	79
2.2.4.1. Isotermas de solubilización. Material no sedimentable - por centrifugación diferen cial.	79
2.2.4.1.a. Concentración proteína - constante.....	79

2.2.4.1.b. Concentración de detergente constante	80
2.2.4.2. Isotermas de solubilización.	
Calorimetría.....	80
2.2.4.3. Segregación lípido-proteína de MP por detergente en gradientes de densidad.....	81
2.2.5. <u>Digestión de MP y BR con enzimas proteolíticas</u>	82
2.2.5.1. Proteólisis de MP.....	82
2.2.5.2. Proteólisis de BR en agua ..	84
2.2.5.3. Proteólisis de células completas de H.H.....	85
2.2.5.4. Proteólisis con papaina de MP fotolizada	85
2.3. METODOS FISICOS	86
2.3.1. <u>Electroforesis de zona de geles de poliacrilamida en SDS: Homogeneidad, pureza y peso molecular</u>	86
2.3.2. <u>Mapas peptídicos. Combinación bidimensional de cromatografía descendente con electroforesis de alto voltaje en papel</u>	88

2.3.3. <u>Determinación de pesos se-</u> <u>cos por gravimetría a pre-</u> <u>sión y temperatura contro-</u> <u>ladas.....</u>	90
2.3.4. <u>Determinación de volúmenes</u> <u>específicos parciales. Me-</u> <u>didias de densidad.....</u>	92
2.3.5. <u>Determinación de c.m.c. de</u> <u>SDS en tampón TRIS-ClH 0,1</u> <u>M, pH = 7,7, mediante con-</u> <u>duotimetría.....</u>	94
2.3.6. <u>Medidas de entalpías de</u> <u>unión. Microcalorimetría..</u>	95
2.3.7. <u>Medida de viscosidades....</u>	95
2.3.8. <u>Ultracentrifugación analí-</u> <u>tica.....</u>	96
2.3.8.1. Velocidad de sedimenta- ción.....	96
2.3.8.2. Equilibrio de sedimenta- ción	96
2.3.8.3. Equilibrio de sedimenta- ción en sistemas de va- rios componentes. Funda- mentos teóricos.....	97
2.3.9. <u>Medidas de difusión</u>	104

2.3.10. <u>Microscopía electrónica..</u>	105
2.3.11. <u>Espectroscopía de absor-</u> <u>ción, emisión y dicroísmo</u> <u>circular en estado estacio-</u> <u>nario.....</u>	105
2.3.12. <u>Fotolisis de destello....</u>	106
2,4. BIBLIOGRAFIA.....	107
CAPITULO III. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	
3.1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE MP Y BR	111
3.1.1. <u>Masa molecular relativa y</u> <u>criterio de pureza de BR</u> <u>por electroforesis en ge-</u> <u>les de poliacrilamida en</u> <u>SDS.....</u>	111
3.1.2. <u>Densidad de MP en agua....</u>	111
3.1.3. <u>Relación proteína:lípido y</u> <u>contenido en fósforo</u>	112
3.1.4. <u>Relación proteína:retinal</u> <u>y contenido en retinal....</u>	113
3.1.5. <u>Coeficientes de extinción</u> <u>molar de BR en distintas -</u> <u>condiciones y longitudes</u> <u>de onda.....</u>	114
3.1.6. <u>Discusión.....</u>	115

3.2. SOLUBILIZACION DE MP Y BR EN SOLUCIONES ACUOSAS CON DETERGENTES.....	119
3.2.1. <u>Isotermas de unión detergente-MP, mediante centrifugación.</u> <u>Desnaturalización de BR en agua con detergente.....</u>	119
3.2.2. <u>Valoración microcalorimétrica de MP, lípidos de MP y BR en agua con SDS</u>	122
3.2.3. <u>Segregación lípido-proteína - mediante gradientes de densidad, y cromatografía en columna.....</u>	123
3.2.4. <u>Discusión</u>	126
3.3. TOPOGRAFIA DE BR EN MP: DIGESTION DE CELULAS COMPLETAS DE H.H., MP Y BR EN AGUA CON ENZIMAS PROTEOLITICOS...	133
3.3.1. <u>Proteolisis de MP</u>	134
3.3.2. <u>Proteolisis de MP fotolizadas con papaina.....</u>	139
3.3.3. <u>Proteolisis de H.H.....</u>	140
3.3.4. <u>Discusión</u>	141
3.4. COMPORTAMIENTO HIDRODINAMICO Y PESO MOLECULAR DE BR EN SOLUCIONES ACUOSAS CON DETERGENTES Y EN AGUA	146

3.4.1. <u>Coefficientes de sedimentación de</u> <u>BR en 1% y 0,1% de SDS y en agua</u>	146
3.4.2. <u>Coefficientes de difusión de BR</u> <u>en 1% y 0,1% de SDS y en agua...</u>	148
3.4.3. <u>Volumen específico parcial de BR</u> <u>en 1% de SDS y en agua.....</u>	150
3.4.4. <u>Peso molecular de BR en 1% de SDS</u>	151
3.4.4.1. Equilibrio de sedimentación...	151
3.4.4.2. Combinación de medidas hidrodinámicas.....	154
3.4.4.3. Dimensiones y forma de la partícula total.....	156
3.4.5. <u>Peso molecular de BR en 0,1% de</u> <u>SDS.....</u>	158
3.4.5.1. Equilibrio de sedimentación ..	158
3.4.5.2. Combinación de medidas hidrodinámicas.....	160
3.4.5.3. Dimensiones y forma de la partícula total	160
3.4.6. <u>Peso molecular de BR en agua ...</u>	160
3.4.6.1. Equilibrio de sedimentación...	160
3.4.6.2. Combinación de medidas hidrodinámicas.....	161
3.4.7. <u>Discusión.....</u>	163

3.5. CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS DE LYH INCORPORANDO BR Y DISCUSION DE LOS EFECTOS DERIVADOS DE DICHA INCORPO- RACION	170
3.5.1. <u>Morfología, tamaño y forma..</u>	172
3.5.2. <u>Espectroscopía de absorción y emisión y dicroísmo circu- lar</u>	173
3.5.3. BR ₄₁₂ , Vida media, dicroísmo lineal. Efecto de la concen- tración de ClNa sobre la vi- da media	174
3.6. DISCUSION GENERAL. MODIFICACIONES AL MODELO ACTUAL DE BACTERIORODOP- SINA EN LA MEMBRANA PURPURA	177
3.7. BIBLIOGRAFIA	182
IV. <u>CONCLUSIONES</u>	185

**CAPITULO I. INTRODUCCION, ANTECEDENTES Y PLANTEA-
MIENTO**

1. INTRODUCCION

1.1. ASPECTOS GENERALES DE INTERES EN EL ESTUDIO QUIMICO-FISICO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION DE MEMBRANAS, DENTRO DE LA TEORIA DE LA DOBLE CAPA LIPIDICA

Quisiera comenzar haciendo propósitos de esforzarme por presentar una selección de la información disponible actualmente sobre estructura y función de membranas, selección que espero sea la que mejor conduzca al planteamiento de esta tesis, al final de este capítulo.

Supongamos el caso ideal de que tuviésemos membranas puras aisladas, utilizando los criterios más estrictos de que disponemos, cuya estructura y función estuviesen bien preservadas respecto de la célula de donde proceden (esto es lo que llamaremos estado nativo), y cuya composición química estuviese bien definida.

En cuanto a la membrana completa, esto es, con todos sus componentes, nos interesaría conocer sus propiedades macroscópicas: forma, tamaño, espesor, densidad; su estado sólido o líquido o de cristal-líquido; viscosidad; dureza; grado de hidratación; carga eléctrica global; índice de refracción; color; permeabilidad a su través de agua, iones, moléculas pequeñas y macromo-

lécúlas; reconocimiento del lado externo e interno con respecto a la célula de donde proceden; susceptibilidad de estas propiedades a temperatura, presión, ultrasonidos, campos eléctricos, campos magnéticos, composición del medio, reactivos químicos, etc.; entre otras cosas.

Yéndonos a aspectos más íntimos, quisiéramos conocer la relación existente entre moléculas de un mismo componente dentro del plano de la membrana y a lo largo de la normal a éste, así como las relaciones existentes entre las moléculas de los distintos componentes entre sí. Todo ello nos explicaría en gran parte las propiedades macroscópicas de la membrana vistas anteriormente.

En cuanto a la relación existente entre moléculas de un mismo componente, serían de especial interés: la disposición de cada componente con respecto al plano de la membrana y a su normal; su contribución a la topografía de las superficies interna y externa de la membrana; su grado y tipo de ordenamiento; su libertad translacional en el plano de la membrana (lateral) y en la normal a éste (flip-flop); su libertad rotacional en ejes paralelos y perpendicular al plano de la membrana; su grado de libertad de cruzar de una membrana a otra vecina (intercambio entre membranas); grado de segregación de la población de cada componente (dominios); por último, la influencia de perturbaciones físicas y químicas sobre estas propiedades.

En cuanto a las relaciones existentes entre moléculas de distintos componentes entre sí, buscaríamos el conocer si existen afinidades selectivas entre moléculas de los distintos componentes que originen - asociaciones específicas entre ellas, y por tanto un cierto grado de segregación de unos componentes de - otros, o si, por el contrario, la distribución de algunos o de todos los componentes moleculares es uniforme en las dos dimensiones de la membrana. En el caso de haber asociaciones específicas, trataríamos de determinar su extensión dentro de las poblaciones moleculares implicadas, así como la naturaleza de la asociación y su distribución en la membrana, si es que - tuviesen una preferencial. Igualmente, nos interesaría la difusión lateral y rotacional de estas asociaciones en el plano de la membrana y fuera de él, así como la libertad que tienen las moléculas que entran en la asociación de intercambiarse con otras de su mismo componente, que están o no formando una asociación específica de la misma o de otra naturaleza. Como decíamos por cada componente molecular, también nos interesaría saber si existen o no dominios para cada tipo de asociación dentro del plano de la membrana, y a lo largo de su normal, y la contribución de cada una de estas asociaciones a la topografía interna y externa de la membrana. Por último, determinaríamos la afectación -

de estas propiedades estructurales por perturbaciones físicas y químicas como dijimos anteriormente para las propiedades macroscópicas.

Tras este nivel de conocimiento de la relación entre moléculas componentes de la membrana, entraríamos en aquel que se ocupa de la estructura y propiedades moleculares de cada uno de los componentes de la membrana por separado, esto es, de los lípidos y de las proteínas de membrana. Este nivel de conocimiento nos explicaría - en gran parte las relaciones existentes entre los distintos componentes dentro y fuera del plano de la membrana, así como parte de las propiedades macroscópicas.

Aquí vamos ya a adelantar que nuestro interés por las proteínas de membrana, es mucho mayor que por los lípidos, pero dada su complementaridad en la estructura y función de membrana no podemos dejar de considerarlos constantemente, si bien en cuanto al trabajo experimental nos hacemos dependientes de la información procedente de laboratorios bioquímicos, fundamentalmente interesados en lípidos de membrana.

Con respecto a los lípidos, una vez separados y cuantificados y conocida su estructura química, pasaríamos posteriormente a explorar su comportamiento en interfaces modelo (1) (2) (3), así como la estructura y propiedades de estas interfaces modelo o modelos de membrana que fuesen capaces de formar cada uno por separado,

tales como monocapas, bicapas planas y bicapas esféricas, mono o multilamelares. El paso siguiente, sería explorar estos modelos formados por mezclas significativas de los distintos componentes lipídicos de la membrana original.

En cuanto a las proteínas de membrana, salvo su singularidad de encontrarse en una interfase en la que los lípidos constituyentes están en mayor o menor extensión en forma de bicapa, son como las proteínas solubles, y así pueden estar constituidas por una o varias cadenas polipeptídicas, las cuales a su vez pueden ser iguales o distintas, y en cuanto a su forma pueden ser regulares o más o menos asimétricas. Igualmente, estas proteínas pueden contener regiones con un grado de independencia variable del resto de la molécula, y en general irán a adoptar estados conformacionales distintos dependiendo de factores externos y relacionados con su función. En estas proteínas habrá además regiones de la molécula especialmente responsables de la asociación con los lípidos vecinos así como con las proteínas adyacentes de la misma u otra naturaleza. Debido a estas - asociaciones proteína-proteína, no siempre va a ser fácil y clara la distinción entre proteína monomérica, - oligomérica o polimérica y complejo multiproteico. El estudio de todos estos aspectos es lo que comprende la caracterización estructural de proteínas de membrana (4).

De las proteínas de membrana refiriéndonos de ahora en adelante selectivamente a las llamadas intrínsecas, una vez solubilizadas, generalmente mediante detergentes, segregadas de los lípidos de membrana y aisladas cada una por separado, nos interesaría al igual que para cualquier proteína soluble, su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria si la hubiese, no olvidándonos de que se trataría no de la estructura en la membrana original, sino en un medio completamente distinto, en solución con o sin detergente. A lo largo de toda esta etapa procuraríamos determinar en que medida la estructura nativa (la que adopta en la membrana) y la función de cada una de las proteínas aisladas se conservan cuando se pasan de la membrana a solución. Cuando la valoración de la función requiera una interfase (ejemplo: generación de un gradiente de concentración, separación de cargas, cambio de conductividad etc.), habría que volver la proteína en estudio a un modelo de membrana bien caracterizado y adecuado para el tipo de función que se quiere valorar (5) (6). En todo caso no podríamos distinguir entre una proteína que retiene su estructura y funcionalidad en solución, y una proteína que cambia en solución, pero reversiblemente alcanza su estructura nativa y su grado de funcionalidad, cuando se vuelve a una interfase adecuada (ver más adelante).

Terminada la caracterización química y químicofísica de los componentes moleculares aislados de la membrana de la que partimos, tendríamos que considerar nuevamente su relación habitual en la membrana natural con los lípidos y con otras proteínas de membrana, así como consigo misma. En este momento pasamos a una nueva etapa de estudio y conocimiento; se trata de aquella - que se ocupa de la reconstitución estructural y funcional de la membrana a partir de sus componentes.

Para ello, trataríamos primeramente de introducir cada macromolécula por separado en modelos de membrana bien caracterizados, monocapas o bicapas lipídicas, y estudiar los cambios originados en la estructura y propiedades del modelo, así como en la medida en que nos permitan nuestros métodos, la estructura y funcionalidad de la macromolécula en este nuevo sistema, comparando esta información con la que tenemos, si es que la tenemos, para la macromolécula en la membrana natural.

Continuaríamos con reconstituciones cada vez - más complejas, tratando de aumentar la información que tenemos de cada macromolécula y viendo en que medida se va afectando por la introducción de nuevos componentes, relacionando todo esto a su vez, con las informaciones - que podamos tener en la membrana natural.

Finalmente, alcanzaríamos la reconstitución total de la membrana natural, tanto su aspecto estructural

como funcional.

En esta etapa contaríamos con que el grado de conocimiento, tanto sobre la membrana como sobre sus componentes, sería muy satisfactorio, con respecto a nuestros objetivos iniciales. Además, si esto se alcanzase, sería una prueba de que los distintos componentes tienen en sí toda la información para disponerse de modo que se alcance la estructura nativa y funcional de la que partimos. Si esto no sucediese, podría ser, o bien porque falta información adicional (algún tipo de matriz ordenadora), sólo disponible en el organismo original y todavía no en el laboratorio, o bien porque hubiésemos fracasado en la selección del procedimiento de reconstitución adoptado.

Esta secuencia de estudio, en general no sigue el orden expuesto ni los niveles de conocimiento están tan bién separados. En la práctica, se avanza y se conoce lo que se puede, y con mucha frecuencia se simultanea el estudio de la membrana nativa con el estudio de los componentes aislados y en modelos de membrana con un grado mayor o menor de reconstitución.

Todo esto que hemos venido discutiendo, que parecería puramente estructural, es la base de la dinámica molecular, y, por tanto, de la función fisiológica de membranas o de su alteración funcional por diversas causas.

Por tanto, su función de separación del interior celular del exterior y de compartimentalización del interior celular, de transporte de materiales a su través, de transducción (conversión) de energía a ella ligada, y de reconocimiento de señales físicas y químicas (receptores), así como de la puesta en marcha de la cadena de acontecimientos que suceden a la interacción membrana-efector, todo reside en su estructura y en la de sus componentes.

Ello es por lo que el poder colocar la membrana que venimos considerando bajo estudio químico-físico en distintas condiciones funcionales, correlacionando qué es estructura y dinámica estructural corresponden a una determinada condición funcional, o viceversa, qué grado de funcionalidad dispone una membrana para una estructura y dinámica molecular conocida, son caminos que nos llevarían a establecer las bases químico-físicas de la actividad vital de la membrana celular que venimos considerando.

Creemos, que este momento es el adecuado para recordarnos, al menos una vez a lo largo de esta introducción, de que no se trata de llegar al conocimiento último, a la esencia, esto no es el objetivo para la ciencia moderna, sino de avanzar nuestro conocimiento de la naturaleza haciéndolo cada vez más profundo y extenso. El arte de convivir con esta limitación de principio, es esencial a la hora de planear investigaciones científicas que tengan objetivos concretos alcanzables.

1.2. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

En membranas biológicas hay conceptos unificadores tanto estructurales como funcionales, por ejemplo la disposición preponderante de lípidos en bicapas y la función de separación de los compartimentos intracelular del extracelular, además de los distintos compartimentos intracelulares entre sí; así como también conceptos peculiares a cada membrana, resultado de la hipertrofia de una propiedad general. Por ejemplo, la estructura y la función singulares de mielina, membranas fotoreceptoras, membranas mitocondriales, membranas fotosintéticas, membranas bacterianas, membranas quimiorreceptoras específicas, membranas secretoras etc. etc.

Son estas características peculiares las que con mucha frecuencia se utilizan para estudiar con mayor facilidad y aprovechamiento una característica general de membrana, teniendo en cuenta después, a la hora de ampliar estos conocimientos obtenidos en un sistema particular a la generalidad de membranas, las limitaciones que impone el paso de lo particular a lo general.

Siguiendo con nuestra idea original de ser selectivo en la utilización de información sobre estructura y función de membranas, utilizando solamente aquella que mejor nos lleve al planteamiento de la presente tesis, nos vamos a ocupar ahora y en los aspectos que son más relevantes para este fin, de dos tipos muy dis-

tintos de membranas, cuyo denominador común es su papel de interaccionar con la luz, si bien las consecuencias de esta interacción son muy distintas en un caso y en otro. Se trata de las membranas fotosensoras y de las membranas fotosintéticas, papeles ambos que se le asignan al sistema de membrana objeto del presente trabajo.

1.2 1. Membranas fotosensoras

Están aquí comprendidas todas aquellas que contienen fotosistemas tales que a la absorción de luz por el fotopigmento correspondiente, sigue una respuesta de parte o de todo el organismo (fototropismo, fototaxia, fotokinesis, fotodiferenciación, fotoregulación, visión, etc.). A esta respuesta va ligado un consumo de energía procedente de otras fuentes distintas a la absorción de la radiación, actuando ésta solamente como un estímulo. Se trata pues de una función sensorial, lo que quiere decir que el proceso básico es una transducción de información más que una conversión de energía.

Esta definición abarca desde membranas fotosensoras de microorganismos, hasta las membranas retinianas del órgano de la visión de vertebrados (7). Por la cantidad de información que existe sobre estas últimas, por nuestro interés personal en ellas, y sobre todo por la similitud de su fotopigmento con la fotoproteína objeto de esta tesis, van a ser las membranas de segmento externo de bastón de vertebrados de las únicas que nos vamos a ocupar ahora.

Estas membranas se han estudiado intensamente tanto in vivo, como en ojo aislado, retina aislada, y - segmentos aislados. El análisis mediante microscopía electrónica, todos los tipos de espectroscopía de luz, y difracción de Rayos X a bajo ángulo, ha mostrado un alto grado de ordenamiento de estas membranas y de orientación del fotopigmento visual (rodopsina) (8).

Alrededor del 50% del peso seco de membrana - de segmento externo de bastón es proteína, y de ésta un 80% es rodopsina, lo que quiere decir que esta proteína es el componente proteico mayoritario en estas membranas. El peso molecular determinado para rodopsina varía desde 20.000 a 40.000 según el laboratorio y el método, siendo 35.000 el valor obtenido por equilibrio de sedimentación (9). Su grupo prostético, el 11-cis retinal, está ligado al grupo amino terminal de una lisina de la proteína por una base de Schiff protonada, que no es accesible ni a BH_4Na ni a NH_2OH . El máximo de absorción del retinal al unirse a la proteína, sufre un corrimiento batocrómico de un centenar o dos de nm según la especie, para el - cual no hay todavía una explicación definitiva.

En la figura 1A, se esquematiza el modelo que hoy se tiene de estas membranas, y se resumen algunas - dimensiones y características tanto de estas membranas como de rodopsina obtenidas mediante varios métodos espectroscópicos. La fotólisis de rodopsina es irreversi-

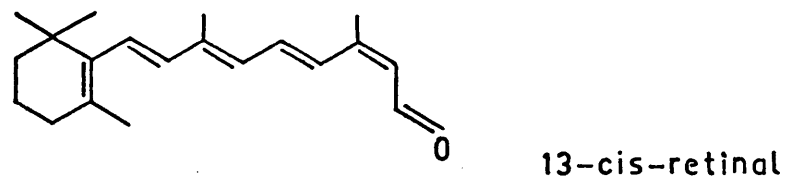
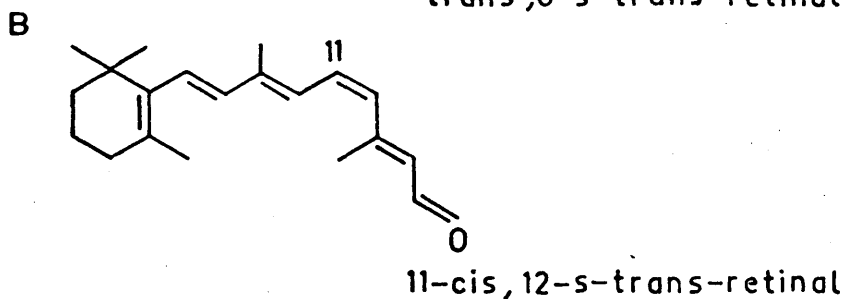
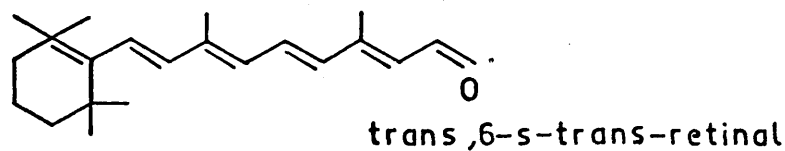
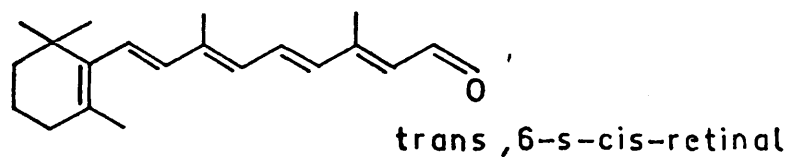
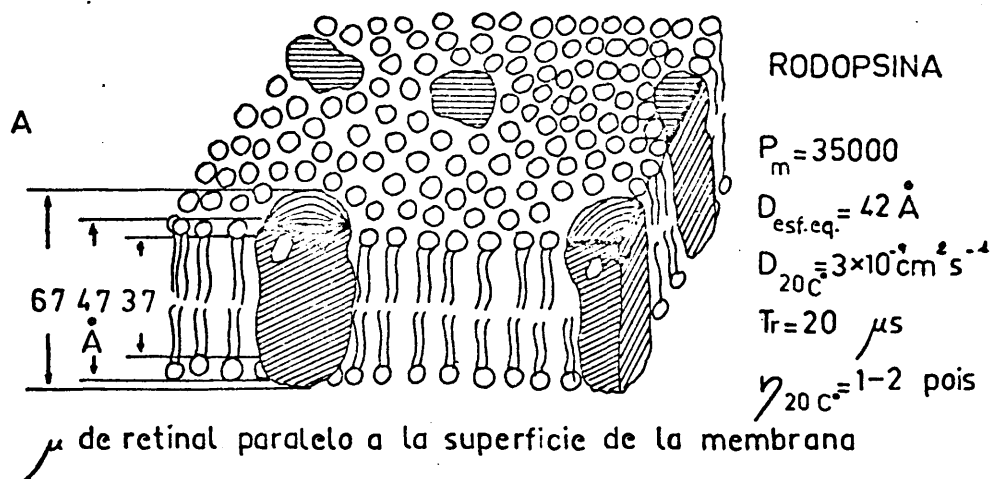


Figura 1.- A, esquema del modelo de membrana de fotoreceptor retina no. B, isómeros de retinal. (P_m = peso molecular; $D_{\text{esf.eq.}}$ = diámetro esfera equivalente; D = coeficiente de difusión lateral; T_r = tiempo de relajación rotacional; η = viscosidad; μ = momento de transición).

ble y el proceso fotoquímico primario se cree que es la isomerización del 11-cis retinal al trans-retinal siendo el primer producto de este proceso la prelumi-rodopsina o batorodopsina₅₄₈, que se forma en menos de 6 pseg. y desaparece con un $t_{1/2}$ de 125 nseg. a temperatura ambiente. (figura 1B).

En cuanto a la identificación del estado excitado implicado en el primer paso del ciclo visual, los bajos rendimientos de cruce entre sistemas ($\phi_{ces_{S_1-T}} \approx 10^{-3}$) y de isomerización por excitación directa para bases de Schiff de isómeros de retinal ($\phi_{iso}^D \approx 10^{-3}$), no permiten suponer que un triplete sea el intermediario en la fotodecoloración (fotólisis) de rodopsina ($\phi_{fot} \approx 0,7$), a no ser que se postule que la interacción opsina-base de Schiff es tal que mejora considerablemente $\phi_{ces}(S_1-T)$ en el nuevo cromóforo. En este sentido, la hipótesis de un complejo de transferencia de carga entre la base de Schiff y la proteína es atractiva, dado que se sabe que en estos complejos el mecanismo de cruce entre sistemas es muy eficiente. En contra de esta hipótesis, está sin embargo el que prelumi-rodopsina₅₄₈ se forma en menos de 6 pseg., lo que exigiría un triplete precursor con una velocidad de desaparición tan alta que lo transformaría en un triplete muy alejado de lo usual (10).

Siguen a este primer proceso fotoquímico, una serie de reacciones térmicas, cuyas entalpías y entropías de activación han sido calculadas, y de cuyos pro-

ductos transientes se conoce su $t_{1/2}$, su espectro de absorción y se cree que están relacionados con cambios conformacionales de toda la proteína. Uno de ellos, metarodopsina₄₇₈ I, con un máximo de absorción a 478 nm. y $t_{1/2}$ de 0,4 mseg. a temperatura ambiente, se ha visto que toma un H^+ de su entorno, compartimento externo del disco de bastón retiniano, al pasar a metarodopsina₃₈₀ II, por lo que este proceso, el único suficientemente rápido que necesita del entorno, parece el candidato para asignársele el papel de la perturbación de la membrana y su hiperpolarización posterior, hiperpolarización que es la base del primer signo de actividad neural en la retina.

Esto nos lleva a la etapa final, la cadena de acontecimientos que van desde el proceso fotoquímico y la serie de reacciones oscuras subsiguientes y la generación del primer impulso neural. La situación está lejos de estar bien definida y existen por el momento tres teorías fundamentales. Una de ellas postula que los cambios conformacionales en la opsina, regularían la actividad de una fosfodiesterasa de membrana, resultando en un descenso de la concentración de GMP-cíclico, el cual a su vez, influiría en la permeabilidad de la membrana. Esta hipótesis, difícilmente aguanta la crítica de que las variaciones de GMP-cíclico serían demasiado lentas como para disparar un impulso neural,

además de la dificultad de explicar el cómo de esta iniciación por GMP.

Es un hecho experimental, que la absorción de luz por segmentos externos origina una hiperpolarización de su membrana externa debido a un descenso en la permeabilidad para Na^+ . Se postula que este cambio de permeabilidad es debido a una liberación de Ca^{++} a través de la membrana de los discos a la membrana plásmatica de segmentos externos durante su irradiación con luz. Esta segunda hipótesis propone por tanto, que la fotólisis de rodopsina facilita el movimiento de Ca^{++} a través del disco, lo que disminuye la permeabilidad de la membrana de segmento externo para Na^+ , hiperpolarizándola.

Una última teoría propone que la captación de H^+ por metarodopsina₄₇₈ I sería el proceso responsable de la conexión entre proceso fotoquímico y fenómeno neural.

Nos queda por último decir, que la regeneración de la rodopsina fotolizada a partir de la opsina y el trans-retinal liberado es un proceso bioquímico que requiere energía.

1.2.2. Membranas fotosintéticas

Las membranas fotosintéticas conocidas hasta hace poco, eran aquellas que contenían en su estructura el sistema clorofila, tales como las de cromatóforos de procariontes fotosintéticos, y las de tilacoides de cloro-

plastos de eucariontes. En estas preparaciones se encuentran basicamente: los fotopigmentos necesarios para la recepción de la energía radiante y su canalización a centros de reacción especializados en utilizar esta energía para la separación de cargas opuestas, convirtiendo la energía luminosa en potencial electroquímico; los enzimas y cofactores necesarios para el transporte electrónico motivado por este potencial, así como aquellos requeridos para la fotofosforilación acoplada a este transporte electrónico; y la membrana soporte para esta maquinaria y estos procesos fotosintéticos básicos. Los cloroplastos de eucariontes son mucho más complejos llegando a tener desde un sistema de reducción de NADP^+ , conectado al ciclo fotosintético, hasta su propio DNA diferente del nuclear.

Dada la complejidad de la organización estructural de estas membranas, no es mucho lo que se conoce sobre su estructura, particularmente sobre la disposición de unos componentes con respecto a otros, y sobre esta disposición a lo largo de las dos dimensiones de la membrana, por lo que su análisis detallado no nos sería muy ilustrativo aquí.

En membranas de tilacoides de plantas verdes se han podido aislar fragmentos que contienen preponderantemente el fotosistema I de otros enriquecidos en fotosistemas II. Por otro lado se sabe que la absorción de luz se

realiza por un número muy elevado de fotopigmentos, conocidos como pigmentos antena o recolectores de luz, cuyos cromóforos tienen sus momentos de transición selectivamente orientados a un determinado ángulo con respecto al plano de la membrana, no sólo para obtener un alto rendimiento en la recolección de energía sino también para una eficiente transferencia de esta energía a su través hasta los llamados centros de reacción (de naturaleza todavía no bien conocida), donde sucede el proceso fotoquímico primario y comienzan las reacciones secundarias subsiguientes.

Desde el punto de vista funcional, se han caracterizado bastante bien los fenómenos macroscópicos - que suceden en estas membranas y algunos de los fenómenos moleculares, si bien en general se sabe poco de la dinámica molecular puesta en marcha por la luz (11) (12) (13) (14).

Las figuras 2A y 2B, muestran los esquemas - del camino que actualmente se cree que siguen los electrones en los fotosistemas de bacterias fotosintéticas y plantas verdes respectivamente.

Algunas de las especies moleculares no están identificadas todavía y muchos de los procesos químicos o físicos representados por flechas están lejos de ser esclarecidos. Igualmente la posición de muchas entidades moleculares en el ciclo es solamente provisional.

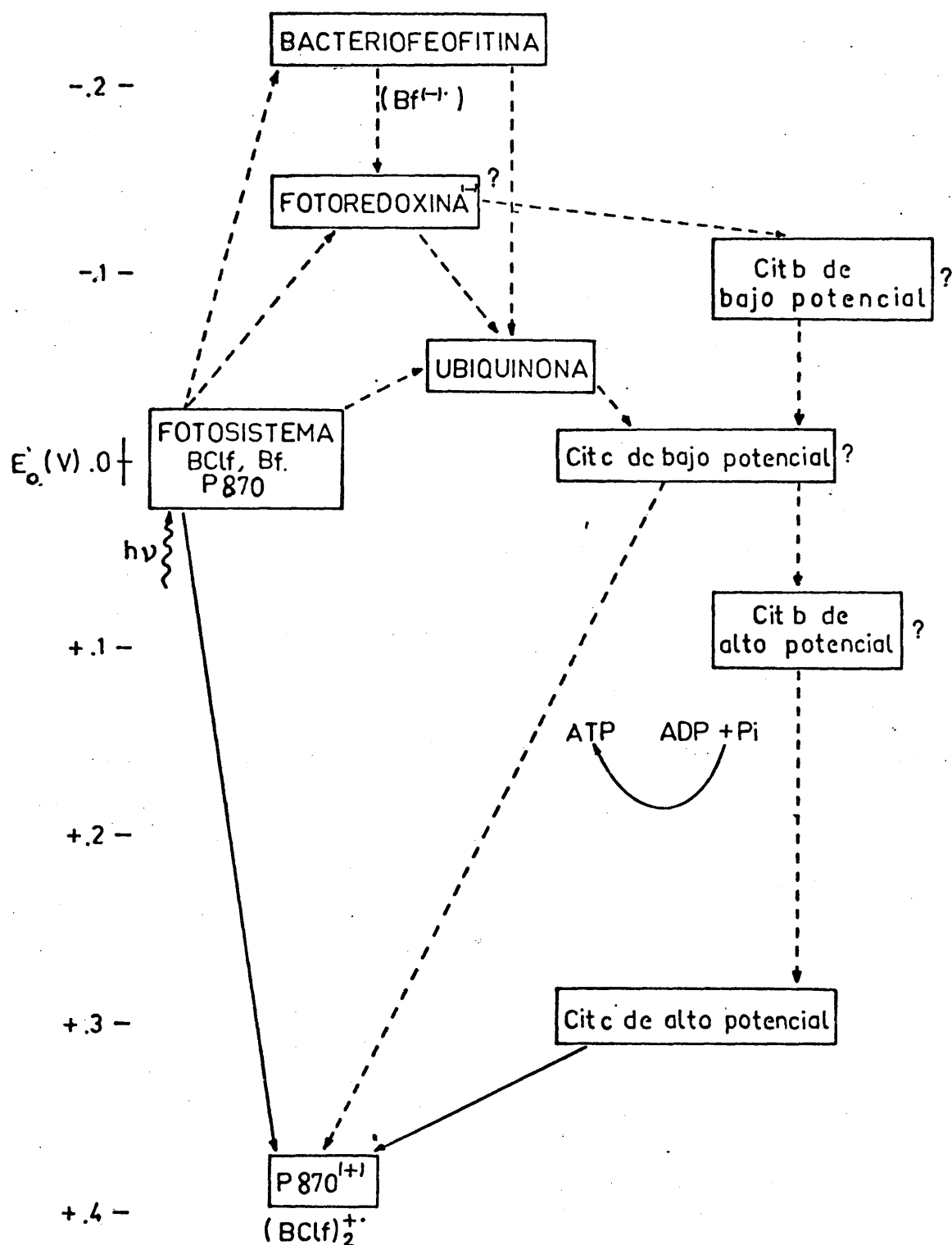


Figura 2A.- Esquema de fotosíntesis en bacterias fotosintéticas.

(BClf)₂⁽⁺⁾• = radical catión del dímero de bacteriocloro-fila.

Bf⁽⁻⁾• = radical anión de bacteriofiofytina.

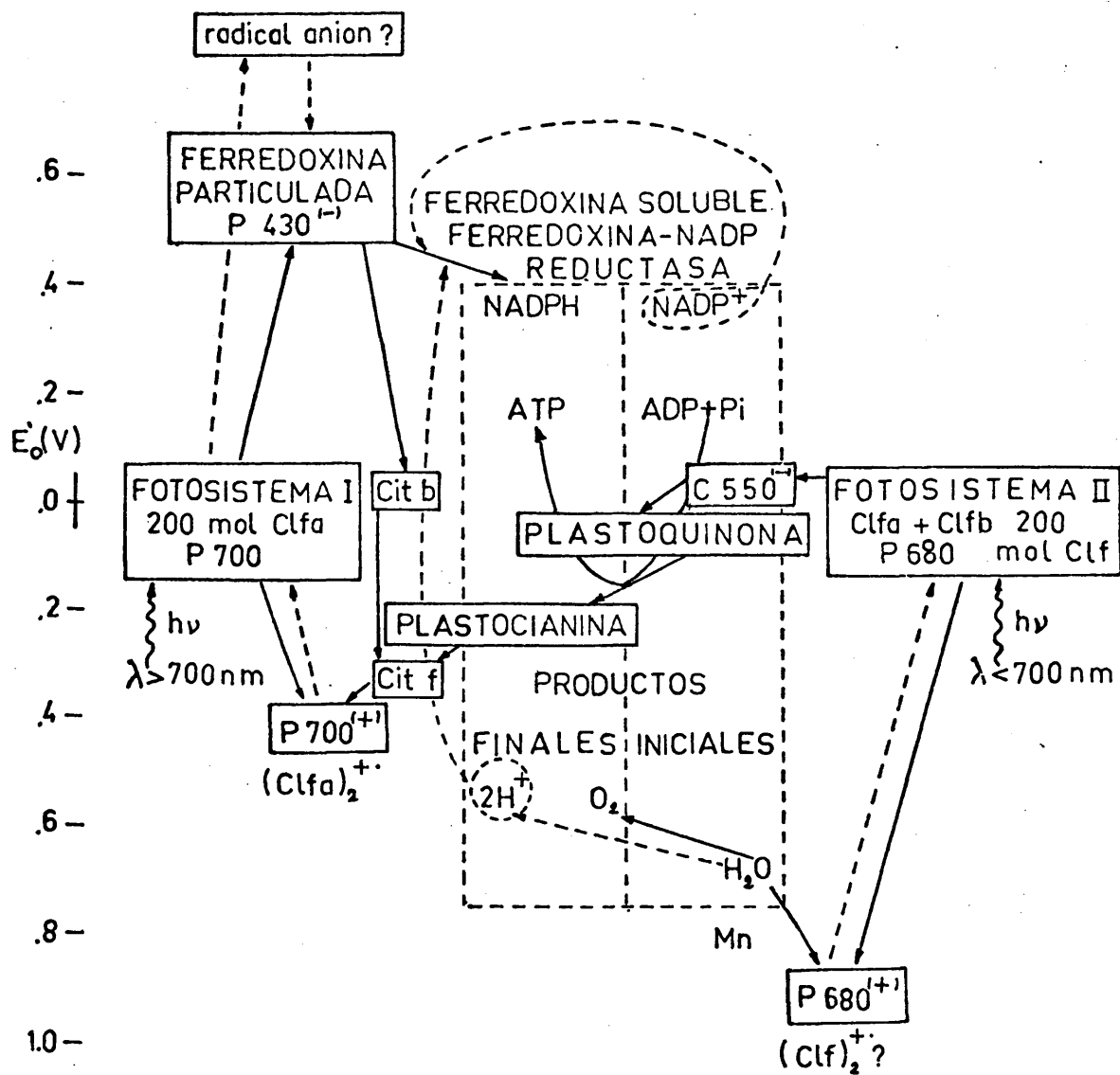


Figura 2B.- Esquema de los dos fotosistemas en fotosíntesis de plantas verdes.

$(Clf_a)_2^{'+\cdot}$ = radical catión de dímero de clorofila a.

Actualmente se está poniendo especial interés en los siguientes aspectos: 1) Diferenciación molecular, entre Clf antena y Clf centro de reacción, entre centro de reacción de fotosistemas I y centro de reacción de fotosistema II y entre ferredoxina particulada y soluble; 2) Naturaleza molecular del sistema de transporte electrónico tanto cíclico como no cíclico en el lado de reducción del fotosistema I, del proceso de recombinación (vuelta al estado fundamental) de P_{700}^+ , P_{680}^+ y P_{780}^+ , y del aceptor de electrones del fotosistema II; 3) Papel y posición de los distintos sistemas redox, tanto en la cadena de transporte de electrones que une fotosistema II con el I como en la que une el aceptor con el donador P_{870} en el sistema fotosintético de bacterias; 4) Mecanismo molecular del acoplamiento del transporte de electrones a la fotofosforilación (ver más adelante). Todos estos son aspectos moleculares de la fotosíntesis que están sometiendo a una prueba ardua casi agotadora, a la bioquímica y biofísica molecular actuales.

Pero una prueba de la fortaleza de estas dos ciencias es que en los dos últimos años y gracias a la utilización de distintas técnicas de espectroscopía de resonancia y espectroscopía óptica con resolución en el pico segundo, se ha realizado un avance considerable en la caracterización de los centros de reacción -

y procesos primarios desencadenados en ellos por la luz (15).

Así se ha podido determinar la presencia de dímeros de clorofila tanto en P_{780} de bacteria como en P_{700} y P_{680} de plantas verdes. Igualmente, se han encontrado una vez más hechos que sugieren la participación de tripletes en el estado excitado previo a la separación de cargas tanto en el P_{780} como en el P_{700} . Los donadores de electrones en estos dos centros de reacción se identificaron con los dímeros $(BChl)_2$ y $(Chl)_2$ respectivamente, los cuales durante el proceso de separación de cargas se transforman en los respectivos radicales cationes. Por otro lado, los aceptores de electrones, Bf en P_{780} y un aceptor todavía no identificado molecularmente pero distinto de ferredoxina en P_{700} , durante la separación de cargas generada por la absorción de luz, se transformarían en sus respectivos radicales aniones.

Una vez vistos los aspectos más relevantes para el presente trabajo de las membranas retinianas y las membranas fotosintéticas clásicas, se expone a continuación el estado actual del proceso de canalización y almacenamiento de la energía liberada durante la oxidación de sustratos en mitocondria y durante la absorción de luz en los sistemas fotosintéticos con clorofila.

1.3. TRANSLOCACION VECTORIAL DE PROTONES COMO MECANISMO UNIVERSAL DE ACOPLAMIENTO ENERGETICO ENTRE CADENAS DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES Y FOSFORILACION OXIDATIVA Y FOTOFOSFORILACION

La energía que se libera durante la transferencia escalonada de electrones entre los sistemas redox (cadena de transporte de electrones) en membranas transductoras de energía de mitocondrias, bacterias y cloroplastos, es la que se utiliza para soportar todos los procesos celulares dependientes de energía, fundamentalmente translocación vectorial de iones o moléculas en contra de un gradiente electroquímico a través de una membrana y las reacciones químicas que transcurren en contra de un potencial químico fuera de la membrana.

Esta energía, que se libera durante la transferencia de electrones, necesita ser canalizada y almacenada en alguna forma de energía potencial que evite su degradación a energía térmica, y permita su posterior utilización en el momento y lugar necesario y en la forma adecuada. Esta forma de energía potencial se acoplaría directamente a procesos que pudiesen emplearla directamente, y sobre todo a la formación de ATP, - que representa el intermediario químico universal de energía potencial.

Estas ideas generales están aceptadas por la

generalidad de los interesados en el tema, pero las discrepancias surgen en cuanto a la forma de esa energía - potencial en la que primordialmente se atrapa la energía liberada por la transferencia escalonada de electrones desde sistemas redox con potenciales más negativos a otros con potenciales más positivos, así como en cuanto al modo en que esta energía potencial se acopla con la formación de ATP.

A este respecto se han propuesto un gran número de hipótesis, todas las cuales pueden clasificarse - en dos grandes grupos: las químicas y las termodinámicas. En las químicas se postula que la energía potencial está almacenada y localizada en moléculas específicas, mientras que en las hipótesis termodinámicas esta energía se asocia a la existencia de una interfase separando dos compartimentos y por tanto a todo el sistema.

Entre las teorías químicas la más primitiva localizaba la energía potencial en enlaces covalentes específicos de "compuestos intermedios de alta energía". Hoy esta hipótesis está abandonada y sustituida por la del "acoplamiento conformacional" (16) en la que se postula que la energía procedente de la transferencia de - electrones motiva cambios conformacionales de la proteína que soporta el aceptor electrónico correspondiente, cambios conformacionales que se transmiten por interacción proteína-proteína dentro de la membrana al comple-

jo de fosforilación (ATP sintetasa) para producir ATP. Por lo de ahora no hay ninguna explicación molecular - satisfactoria para este tipo de acoplamiento conformacional. En esta teoría la translocación de protones es incidental a los cambios conformacionales.

Entre las teorías termodinámicas destaca como la más aceptada actualmente en Bioenergética, la - "teoría quimiosmótica" de Mitchell (17). Este autor postula que la transferencia de electrones, debido a la - disposición asimétrica de los componentes de la cadena de transporte electrónico motiva un movimiento vectorial de protones, movimiento al que se liga la aparición de un gradiente de potencial electroquímico de H^+ conocido como "fuerza motora de protones", Δp , suma de una diferencia de potencial eléctrico a través de la - membrana ($\Delta \psi$) y de un término de Nerhst, con la relación de actividades termodinámicas de H^+ a ambos lados de la membrana (ΔpH).

Este potencial químico, por unidad de carga eléctrica, Δp , es el que va directamente a motivar la translocación de otros iones en contra de un gradiente de concentración, o bien va a utilizarse por el complejo de fosforilación (ATP sintetasa) dentro de la membrana para la síntesis endergónica de ATP.

En los últimos años se ha demostrado en varios laboratorios que tanto $\Delta \psi$ como ΔpH , cada uno por

separado, pueden motivar síntesis de ATP, siempre que al canoen un valor umbral determinado, si bien en estado es tacionario solamente ΔpH parece estar presente en una mag nitud significativa.

La teoría quimiosmótica se basa en cuatro pos-
tulados fundamentales ligados a cuatro sistemas estructu-
rales y funcionales:

1) La ATP sintetasa es una ATPasa translocadora de H^+ reversible y localizada en la membrana con una este-
quiometría $\rightarrow H^+/P$ característica.

2) Las cadenas respiratorias y fotoredox son siste-
mas metabólicos vectoriales translocadores de protones,
localizados en la membrana, con una estequiometría $\rightarrow H^+/
/2e^-$ característica y que tienen la misma polaridad de
translocación de protones a través de la membrana por -
su actividad redox de potenciales más negativos a poten-
ciales más positivos, como tiene la ATPasa para la hidró-
lisis de ATP.

3) Hay sistemas portadores de solutos ligados a pro-
tones (o a iones hidroxilo) para transporte de metaboli-
tos y estabilización osmótica.

4) Los sistemas 1, 2 y 3 están insertos en una mem-
brana aislante topológicamente cerrada llamada la membra-
na de acoplamiento, que tiene una fase no acuosa que ac-
tua de barrera osmótica de baja permeabilidad para solu-
tos en general y para protones e iones hidroxilo en par-
ticular.

Actualmente hay una considerable evidencia experimental que apoya estos cuatro postulados, si bien la dinámica molecular de como sucede la translocación de protones está lejos de ser conocida.

1.4. MODELOS DE MEMBRANA INCORPORANDO PROTEINAS DE MEMBRANAS NATURALES. RECONSTITUCION FUNCIONAL

Como hemos visto hasta ahora, primero de un modo general y después en sistemas concretos, la estructura y dinámica moleculares de membranas naturales son muy complejas y en algún momento durante su estudio, se hace necesario aislar sus entidades moleculares y funcionales concretas y reconstituírlas lo más próximamente a su estado nativo como sea posible, en modelos de membrana sencillos. Estos sistemas artificiales por su sencillez y -peouliaridades nos permiten obtener una información que nuestros métodos de estudio no son capaces de obtener en la membrana natural, o bien la información que se obtiene es más precisa y exacta.

La creciente actividad en incorporación de proteínas de membrana en modelos es debida, por un lado, al desarrollo de metodos de aislamiento y purificación de - estas proteínas, y por otros a la disponibilidad de técnicas para la preparación y estudio de sistemas lipídicos artificiales.

Cada uno de los tres tipos de modelos, monocapas, bicapas planas y bicapas esfericas, tienen sus ven-

tajas y desventajas, por lo que para cada aspecto concreto de estudio se utiliza selectivamente uno u otro, y con frecuencia más de uno, de modo que se suplan las limitaciones de información inherentes a cada uno de ellos con la información obtenida en otro.

Así, las monocapas (6) nos van a proporcionar información sobre área, orientación, empaquetamiento e interacciones moleculares y transiciones y segregaciones de fase dentro de la monocapa, así como sobre las consecuencias que sobre estos parámetros moleculares van a tener los cambios en la composición, temperatura etc. de la subfase. Sin embargo, cuando se requiera una bicapa limitada por dos fases acuosas a cada lado no se podrá utilizar este método. Esta gran limitación, hace que las monocapas sean el modelo menos satisfactorio y menos utilizado de los tres. Actualmente (21), una técnica recientemente introducida para la formación de bicapas libres de solventes orgánicos a partir de dos monocapas en la interfase aire-agua, parece que va a dar a las monocapas un papel mayor, ya que va a permitir por un lado correlacionar las propiedades de las monocapas con las de las bicapas formadas a partir de ellas así como formar bicapas asimétricas. Por lo de ahora hay muy poco trabajo experimental hecho con monocapas puras de proteínas de membrana.

Las bicapas esféricas monolamelares (liposomas) son los sistemas sintéticos hoy más utilizados

con fines de reconstitución, muy posiblemente, debido a que por su geometría y métodos de preparación, la facilidad con que se incorporan proteínas de membrana a su pared es muy grande, al contrario de lo que sucede con bicapas planas.

Técnicamente estas bicapas esféricas son muy adecuadas para estudios químicos, calorimétricos, morfológicos, hidrodinámicos, electroforéticos, fotoelectroquímicos, y espectroscópicos de muy distintos tipos, si bien tienen dos grandes limitaciones. Una de ellas es la dificultad de variar a voluntad la composición de las dos fases acuosas limitantes. La otra es la imposibilidad de realizar medidas eléctricas directas entre estas dos fases.

Estructuralmente, los liposomas incorporando proteínas, son los modelos más empleados para estudiar el efecto de la inserción de proteínas en su pared sobre propiedades de lípidos y proteínas de membrana (18), así como su dependencia con la composición de la membrana (naturaleza de cabezas polares y cadenas hidrofóbicas de los lípidos, relación lípido-proteína, naturaleza de otras proteínas presentes), la composición y asímetría de las fases acuosas, gradientes electroquímicos a través de la membrana, temperatura, etc. Entre las propiedades de lípidos más estudiadas en estas preparaciones tenemos: microviscosidad; distribución asimétri-

ca entre su capa interna y externa; transiciones y separaciones de fases; libertad rotacional, traslacional - (siguiendo el plano de la membrana) y de intercambio entre las dos monocapas dentro de una misma vesícula así como entre las monocapas externas de vesículas distintas. En cuanto a las propiedades de proteínas se han estudiado: disposición a lo largo de la normal al plano de la membrana; asimetría y topografía de las zonas accesibles a las fases acuosas; orientación con respecto al plano de la membrana; algunas características de estructura secundaria; y libertad rotacional y lateral.

Estos modelos, sin embargo, dado la escasa variación de su tamaño y densidad al introducir proteínas en su pared se han mostrado poco útiles para la caracterización de proteínas de membrana mediante métodos hidrodinámicos y métodos de equilibrio tradicionales en química-física de proteínas.

Funcionalmente los liposomas, junto con las bicapas planas, se han empleado para reconstituir una amplia gama de sistemas tratando de reproducir, simular o caracterizar una función determinada(5). Así, se han estudiado complementariamente con ambos modelos: selectividad iónica de ciertos antibióticos e ionóforos obtenidos de biomembranas; excitabilidad eléctrica que imponen ciertos antibióticos a las membranas donde se han incorporado; transporte activo por incorporación de ATP-

asas, (Na^+ - K^+ - ATPasa, Ca^{++} -ATPasa, H^+ -ATPasa); transporte de azúcares (complejo sacarosa-isomaltasa); reacciones de transferencia de electrones (mitocondriales, microsomales y fotosintéticas); reacciones de fosforilación oxidativa (reconstitución de sitios I, II y III de acoplamiento); fenómenos de fototransducción - (con rodopsina bacteriana y con rodopsina visual); y - reconocimiento de señales químicas y formación de complejo ligando-receptor (receptor colinérgico, receptores para otras hormonas, antígenos superficiales, etc.).

Por último, las bicapas planas (20) incorporando proteína tienen bastante que añadir a lo ya expuesto para los modelos anteriores, además de lo dicho en el párrafo anterior sobre su uso junto con liposomas en estudio de reconstitución y caracterización funcional.

Primeramente, estos sistemas sintéticos, dado que sus dos fases acuosas limitantes son fácilmente accesibles, presentan la ventaja de poder tanto variar a voluntad la composición de estas fases, como de hacer medidas eléctricas entre ellas a través de la membrana. Esto hace que las bicapas planas sean estrictamente indispensables para ciertos estudios, permitiendo medidas de transporte, conductividad, espesor dieléctrico, potencial y fotoelectroquímicas, con y sin proteínas de membrana incorporada.

Por otro lado, dada la facilidad de orientar estas bicapas, son especialmente útiles para determinar la orientación de cromóforos y estudiar fenómenos de transferencia de energía entre cromóforos con significación funcional (19).

Quedan sin embargo por superar en estos modelos la dificultad para la incorporación de proteínas así como la frecuente no reproducibilidad de reconstituciones efectuadas en ellos.

Completamos las observaciones al comienzo de esta sección sobre modelos con proteínas de membrana diciendo que su utilización conjunta nos va a permitir utilizar la mayor parte de las técnicas disponibles y por tanto estudiar la mayor parte de los problemas estructurales y funcionales de membranas a diferentes niveles de organización y de conocimiento.

2. MEMBRANA PURPURA DE ALOBACTERIUM HALOBIUM-BACTERIO RODOPSINA: ESTRUCTURA Y FUNCION

2.1. ANTECEDENTES HASTA 1.974

La afinidad por la sal y la necesidad de concentraciones de ClNa en el medio muy altas, casi de saturación, que tienen determinados microorganismos para vivir y reproducirse, es lo que se conoce en Microbiología con el nombre de halofilismo extremado. Estas halobacterias son Gram-negativas, aerobias obligadas, de color rojo o anaranjado, generalmente abastanadas, fla

geladas cuando móviles, que se lisan cuando se exponen a soluciones hipotónicas (22).

Las halófilas siempre atrajeron la atención de algunos bacteriólogos y bioquímicos, sobre todo por sus condiciones de vida en los límites de las posibilidades fisiológicas, al igual como lo han hecho las termófilas por ejemplo.

Ultimamente sin embargo, el interés por algunas razas de halófilas ha crecido espectacularmente desde el comienzo de los años setenta. El motivo fue el descubrimiento por Oesterhelt y Stoeckenius (23) de un sistema fotosintético nuevo en su membrana celular, sistema Bacteriorodopsina, que es distinto al hasta ahora conocido sistema fotosintético de clorofila de plantas verdes y algas y al de bacterioclorofila de procariontes fotosintéticos. Por su sencillez, novedad y otras peculiaridades que iremos viendo, este sistema se ha convertido en la actualidad en una activa área de investigación bioquímica y biofísico molecular, donde microbiólogos, morfólogos, bioquímicos, químicos, químico-físicos, biofísicos y físicos colaboran para caracterizar estructural y funcionalmente esta proteína.

Cuando suspensiones de células de Halobacterium Halobium R₁ (H.H) en ClNa 4,3 M se dializan frente a soluciones de ClNa de concentración decreciente, se observa que primeramente pierden su forma abastona-

da, después su barrera celular formada por pared y membrana celular se hace permeable a la mayoría del contenido intracelular, que se escapa a su través. A concentraciones alrededor de $\text{ClNa } 2 \text{ M}$ la pared celular comienza a desintegrarse y disolverse y alrededor de $\text{ClNa } 1 \text{ M}$ los sacos de membrana celular vacíos se fragmentan en laminitas de 100 á 500 nm de dimensión mayor, que mediante centrifugación en gradientes de densidad se separan en dos fracciones: una de baja densidad llamada fracción de membranas rojas (MR) y otra de mayor densidad llamada fracción de membranas púrpuras (MP) (25).

Esta fracción de MP vista al microscópico electrónico consiste en laminitas bastante uniformes en tamaño con un diámetro máximo de alrededor de 500 nm y 5 nm de espesor, que presentan en su superficie fracturas cortas y lineales, formando entre ellas ángulos de 60° á 120° . Espectroscópicamente muestran una banda de absorción en el visible, $\lambda_{\text{máx.}} 570 \text{ nm}$, que en la oscuridad se corre a 560 nm, y químicamente se determinó que el 75% de la membrana es proteína y el resto lípidos (26).

Relacionando micrografías electrónicas de MP con micrografías de membrana celular total, se dedujo - que el material de la fracción de MP no estaba difuso - sobre la membrana celular sino que formaba una serie de áreas discretas, incluidas sin solución de continuidad en la membrana celular.

Mediante combinación de difracción de Rayos X a ángulos bajos y microscopía electrónica, se reconoció la existencia de una red hexagonal en el plano de MP, cuya celda unidad constaba de tres moléculas de proteína y 40 moléculas de lípidos (27). Por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, se caracterizó una única proteína con un peso molecular aparente de 26.000 y en su composición de aminoácidos se observaba que un 62% eran no polares, lo que estaba de acuerdo con la información obtenida por rayos X de que una gran parte de cada molécula tenía que estar dentro del interior de la membrana.

Después de observar que el color púrpura desaparecía al extraer las membranas con solventes orgánicos o disolverla en agua con SDS, se analizó su contenido en retinal y se vió que el retinal estaba ligado a una lisina de la proteína mediante una base Schiff, al igual que en la rodopsina visual, por lo que a esta proteína de MP se le llamó bacteriorodopsina (BR). Esta base de Schiff no era susceptible a reactivos tales como NH_2OH y BH_4Na , a no ser que simultáneamente se irradiase con luz visible, con la destrucción consiguiente del complejo púrpura (λ máx. 568 nm). Este complejo también se destruía al disolver MP en BCTA a $\text{pH} = 8,0$ y se alteraba reversiblemente al bajar el pH a 2,5 presentando entonces un color azul (λ máx.

603 nm.) (26). Posteriormente, Mendelsöhn (28) interpreta sus observaciones mediante espectroscopía de resonancia Raman, como que el color púrpura es debido a una base de Schiff no protonada, cuyo sistema π electrónico está perturbado por interacciones en la proteína, posiblemente un complejo de transferencia de carga entre retinilidenolisina y una o varias cadenas laterales de aminoácidos de la proteína, siendo el grupo indólico de triptófano un buen candidato. Esta perturbación explicaría en parte el corrimiento al rojo existente al pasar de retinilidenolisina aislada a BR o rodopsina visual.

En 1.973, Oesterbelt y Hess encuentran que suspensiones de MP en solución 4,3 M de ClNa saturada en éter, se fotolizan reversiblemente con la luz, formándose un compuesto con un máximo de absorción a 412 nm, y que en la oscuridad reaparece el complejo púrpura con una constante de velocidad de $0,04 \text{ sg.}^{-1}$, a 20° C. El rendimiento cuántico de fotólisis era de 0,79 y su espectro de acción era idéntico al espectro de absorción del complejo púrpura. La regeneración de éste, al contrario de la fotólisis, era dependiente de la temperatura con una energía de activación de 11,4 Kcal./mol. Por último, observaron que la fotólisis va acompañada de un descenso en la intensidad de fluorescencia de triptófano de la membrana y liberación de pro-

tones, y que la regeneración está ligada a la restitución del nivel de fluorescencia original y captación de la misma cantidad de protones que había sido liberada, teniendo ambos procesos la misma vida media que el proceso de regeneración.

Este mismo año, Oesterhelt y Krippahl (30) - encuentran una inhibición por la luz de la respiración de células completas de H.H con un rendimiento cuántico de 0,3. Oesterhelt y Stoeckenius (23), estudiando - el efecto de la luz sobre consumo de oxígeno, biosíntesis de MP y translocación de protones, proponen para - MP una función fotoacopladora mediante el gradiente de protones generado por la absorción de luz a través de la membrana celular (interior alcalino con respecto al exterior). Estos autores y Razi-Naqvi y otros (31) son los primeros en determinar mediante flash fotólisis una vida media de 5-6 mseg. para la especie transiente $(BR)_{412}$, en agua a temperatura ambiente, equivalente a la especie observada por Oesterhelt y Hess en solución 4,3 M de ClNa saturada con éter, con una vida media de 13 seg. Razi-Naqvi y otros, además observaron que la - absorción del transiente de BR_{412} nm era fuertemente - dicroica y que el dicroísmo no decaía durante el tiempo de observación de la especie, de lo que concluyeron que el cromóforo estaba inmovilizado en la membrana, - al contrario de lo que se había observado en rodopsina

visual (32).

En la segunda mitad de 1.973, Danon y Stoeckenius (33) comunican el papel de MP en células completas en la biosíntesis de ATP motivada por la luz, confirmando el papel de BR como bomba de protones movida por la luz, y el acoplamiento del gradiente electroquímico producido a la fosforilación de ADP. Simultáneamente, Racker y Stoeckenius (34), utilizando un sistema totalmente sintético, al que se había incorporado primero bacteriorodopsina y que fototranslocaba H^+ en dirección opuesta a como lo hacen las células completas, y al que posteriormente se añadió H^+ -ATPasa mitocondrial, pudieron reconstituir la fotofosforilación observada por Danon y Stoeckenius en células completas. Al final de 1.973, Racker y Hinkle (35) incorporan BR a liposomas de dimiristoil fosfatidilcolina, demostraron que la fototranslocación de protones en estas vesículas no se bloqueaba al bajar la temperatura por debajo de la temperatura de transición del lípido, de lo que dedujeron que el mecanismo molecular responsable de la translocación no implicaría un transportador móvil, sino más bien lo que se entiende habitualmente por un canal o poro. Esto estaba de acuerdo con la rigidez de BR que se había visto en la membrana natural mediante dicroísmo de BR_{412} (31) y difracción de rayos X (27).

En 1.974 Oesterhelt y otros (36) (37) demues-

tran la formación de una apomembrana (pérdida del complejo púrpura) por acción de la luz sobre MP, aislada o en células completas, en presencia de NH_2OH y la reconstitución del complejo púrpura mediante incubación de esta apomembrana con 13-cis-retinal o trans-retinal. Estructuralmente es significativo el hecho de que, las apomembranas sí se formaban en células completas tenían una densidad menor que si se preparaban sobre MP aisladas. En este último caso tenían la misma densidad que MP. Esto fue interpretado por diversos autores, como - que las moléculas de bacterio-opsina al interaccionar más débilmente entre sí que las de BR, que normalmente forman una red cristalina, permiten la redistribución de lípidos en la membrana tras la rotura de la unión - retinal-bacterioopsina, sin difusión lateral de bacterioopsina a otras regiones de la membrana, ya que las apomembranas aisladas de células completas no presentaban más que una sola proteína bacterio-opsina. Esta - redistribución no era posible en MP aislada.

En este mismo año, Stoeckenius y Lozier (38) proponen un ciclo fotoquímico primitivo completado con la información obtenida mediante espectroscopía Raman de resonancia por Lewis y otros (39), los cuales combinando adecuadamente iluminación, deuteración y temperatura demostraron que la base de Schiff retinilidenolisina estaba protonada en BR_{570} y no protonada en la

especie transiente BR_{412} , explicando que la tensión $C=N$ a 1.622 cm^{-1} que había visto Mendelsohn (28) anteriormente, y atribuido a BR_{570} por suponerle fotoquímicamente estable, procedía en realidad de BR_{412} mantenida en estado fotoestacionario por la alta energía del láser utilizado.

En este mismo año, el grupo ruso de Skulachev (40) (41) (42) demuestra la naturaleza electrogénica - de la fototranslocación vectorial de protones por BR - directamente en membranas planas e indirectamente en liposomas; esto es, encuentran que la distribución asimétrica de H^+ determina un potencial eléctrico a través de la membrana.

En liposomas conteniendo BR en su membrana, observaron que durante su iluminación se acumulan iones PCB^- (fenildicarboundecaborano) en su interior (y positivo en el interior con respecto del exterior), liberándose en la oscuridad de acuerdo con experimentos similares de Racker y Hinkle (35) con tetrafenilborano. Esta acumulación de PCB^- sigue paralela a otra de atebrina, base débil, que se pone de manifiesto mediante la disminución de su fluorescencia y se utiliza como prueba de formación de ΔpH (interior más ácido que el exterior).

La prueba directa la hicieron con bicapas planas a las que se había incorporado BR de dos modos distintos. Por un lado, mezclando fosfolípidos con MP

en decano y formando las membranas a partir de esta solución. Por otro lado, adsorbiendo y fusionando liposomas con BR a bicapas lipídicas planas preformadas. En el primer tipo de films encontraron fotopotenciales de hasta 50 mV, en el segundo de hasta 150 mV.

Hasta aquí era el grado de progreso que se había alcanzado en el conocimiento de la estructura de MP y BR cuando nosotros nos planteamos la presente tesis.

2.2. PROGRESO REALIZADO DESDE 1.974 HASTA LA ACTUALIDAD

Nos queda recoger la información obtenida en estos dos últimos años que quisieramos hacer breve y selectivamente, de modo que nos ayude especialmente en la discusión de nuestros resultados. Trataremos de ir desde lo estructural hasta lo funcional, primero para el año 1.975 y después para 1.976.

2.2.1. Estudios estructurales

Estudiando las configuraciones isoméricas del cromóforo de BR mediante cromatografía en capa fina de retinal y derivados de retinaloxima, Jan (43) encuentra que la forma oscura de BR, BR₅₆₀ contiene 13-cis-retinal, mientras que tanto la forma adaptada a la luz, - BR₅₇₀, como BR₄₁₂ contienen trans-retinal. Esto hace suponer que no hay isomerización del cromóforo durante el ciclo fotoquímico, lo que permite una regeneración rápida

da del estado inicial y por tanto una alta eficiencia.

Chignell y Chignell (44) utilizando tres etiquetas de spin derivadas del ácido esteárico, ven mediante RPE que la estructura de MP es muy rígida, e interpretan que una gran parte de los lípidos está asociada con BR, encontrando una transición a 29° C. que atribuyen a un cambio estructural de BR, reversible. - Esto está de acuerdo con la inmovilidad de BR observada mediante dicroísmo lineal con resolución temporal y con la idea de asignar a BR un mecanismo de canal o poro, más que de translocador móvil deducida de experimentos de fototranslocación de H^+ en liposomas por debajo de la temperatura de transición del lípido así como con la estructura cristalina observada por difracción de rayos X.

Durante 1.975 aparecieron dos trabajos de difracción de rayos X y uno de difracción de electrones en MP, que vamos a comentar con detalle por su transcendencia estructural.

Blaurock (45) propone que las moléculas de BR en MP están dispuestas en grupos de tres, con un eje ternario perpendicular al plano de la membrana en el centro del grupo. Las moléculas de BR atraviesan la membrana de lado a lado y se orientan todas en la misma dirección. Encuentra una discrepancia entre las tres moléculas de BR que su modelo introduce por celda uni

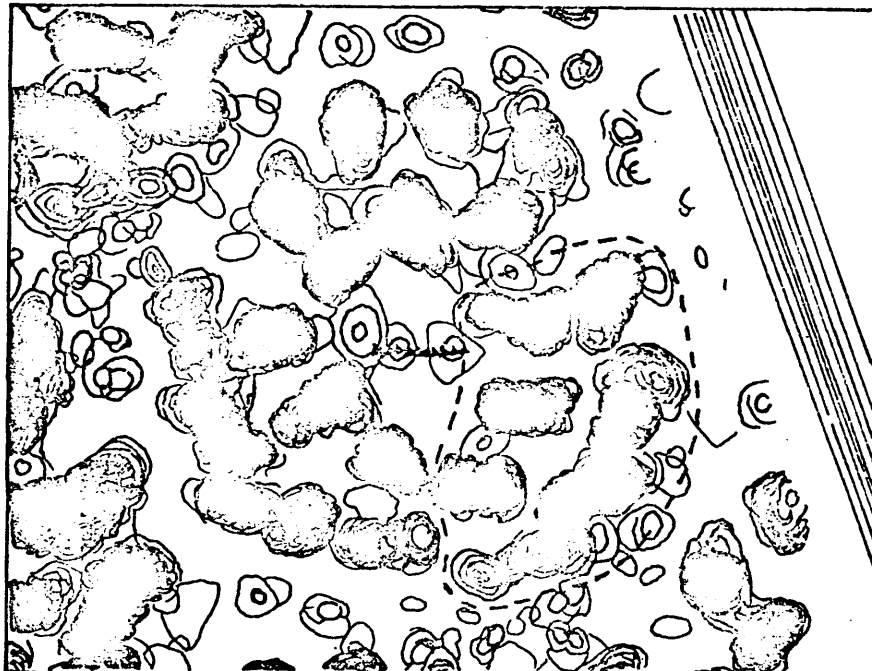
dad, y el número calculado, 3,4, a partir del volumen de la celda unidad, el peso molecular de BR de 26.000, y demás datos analíticos disponibles hasta entonces. Además, propone que los lípidos están dispuestos en dos capas, como en una bicapa, pero probablemente con una distribución cuantitativa asimétrica, y posiblemente están localizados en regiones discretas de unos 20 Å de diámetro, entre los grupos de proteínas. Con respecto a la estructura de BR misma, sugiere la existencia de segmentos de α -hélice más o menos perpendiculares al plano de la membrana y empaquetados, de los que al menos dos estarían un poco inclinados con respecto a los otros.

A partir de su diagrama de difracción, Henderson (46) propone una estructura muy parecida a la de Blaurock, esto es, proteínas y lípidos empaquetados en una red hexagonal P_3 . Las proteínas dispuestas en una sola capa y orientadas en la misma dirección - a través de la membrana, y los lípidos formando áreas de bicapas entre las proteínas. En cuanto a la estructura de BR, propone la existencia de segmentos de α -hélice de 25-35 Å de largo, perpendicularmente dispuestos con respecto al plano de la membrana, agrupándose en superhélices.

Por último, Henderson y Unwin (47) construyen un mapa tridimensional de la membrana con una re

solución de 7 \AA , mediante microscopía electrónica, una vista del cual se muestra en la figura 3A. En ella se ven moléculas de proteína agrupadas alrededor de un eje ternario y los límites probables de una de ellas están marcados con línea discontinua. Cada proteína contiene 7 segmentos de α -hélice de $35\text{-}40 \text{ \AA}$ de longitud, dispuestos perpendicularmente al plano de la membrana, empaquetados a distancias de $10\text{-}12 \text{ \AA}$ entre sí y ligeramente inclinados unos con respecto de los otros a ángulos entre cero y 20° , que supondrían un 80% de la proteína, para un peso molecular de 26.000. A partir de este mapa se ha construido un modelo para BR, figura 3B con unas dimensiones totales para la proteína de $25 \times 35 \times 45 \text{ \AA}$, la dimensión mayor perpendicular al plano de la membrana y paralela a las α -hélices. El agrupamiento de las tres proteínas más próximas alrededor del eje ternario, se realiza, de modo que tres α -hélices de las siete de cada proteína se disponen formando una corona central - de nueve α -hélices, con una separación de 10 \AA entre hélices vecinas. El resto de las hélices forma una corona externa a la anterior de 12 α -hélices con una distancia entre hélices vecinas e inclinación mayores que en la corona externa. Esta inclinación lleva a una superposición cuando se miran perpendicularmente al plano de la membrana, y la dirección de esta inclinación coincide con la que tendría una superhélice izquierda formada por

A



B

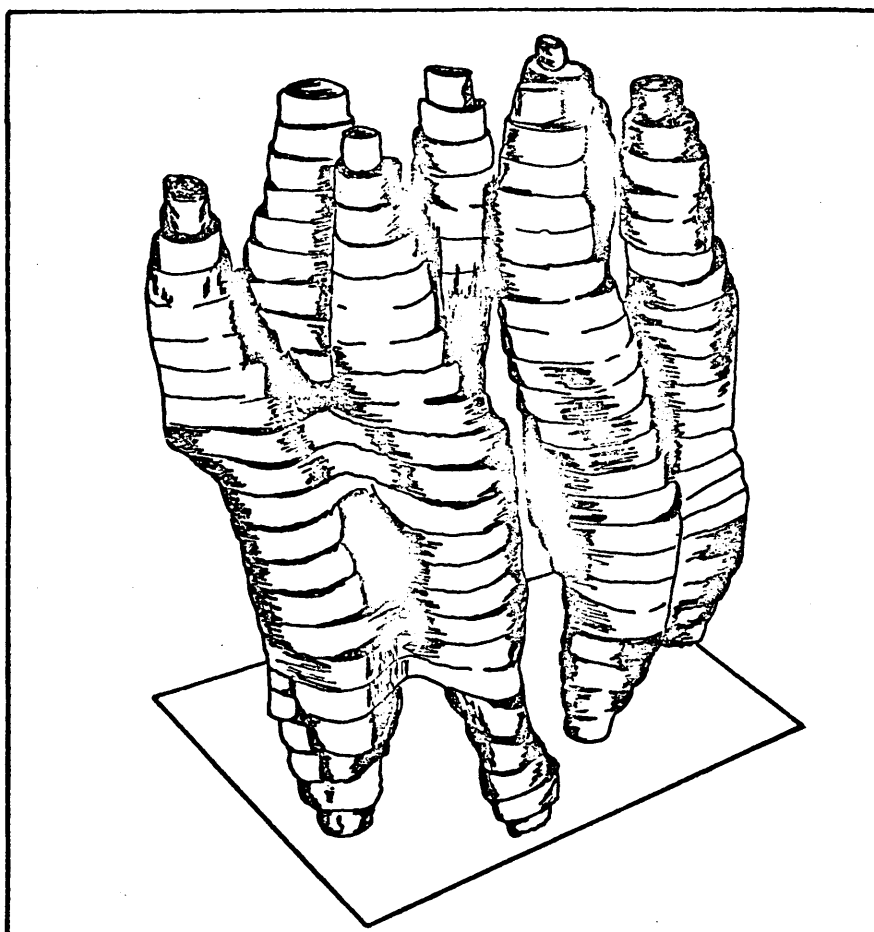


Figura 3.- A, mapa tridimensional de la membrana púrpura obtenido por microscopía electrónica con una resolución de 7 Å. B, modelo propuesto para BR (HENDERSON, R. y UNWIN, N.T. Nature, 257, 28 (1.975)).

α -hélices derechas. En el centro de la corona interna, queda un espacio de 20 \AA de diámetro, que estaría relleno de lípidos en forma de bicapas. Igualmente los espacios entre estos agrupamientos de proteínas estarían llenos con bicapas lipídicas.

Por tanto, en este modelo, BR sería una proteína globular expuesta a ambos lados de la membrana. A la resolución conseguida no se puede discernir ni las conexiones entre hélices, ni la molécula de retinal.

Dos grupos independientes (48) (49) (50) han demostrado que el espectro de D.C. de MP en el visible consta de dos contribuciones, una banda positiva ancha centrada a 570 nm. debida a la interacción retinal-proteína y una banda bifásica de acoplamiento excitónico - debida a la interacción entre los cromóforos de complejos púrpura de moléculas vecinas en la red hexagonal. En experimentos de regeneración de apomembranas con retinal, se observa que la intensidad de la banda positiva aumenta linealmente con el porcentaje de reconstitución mientras que la banda excitónica bifásica aumenta cuadráticamente con este porcentaje, lo que explica su procedencia de acoplamiento excitónico entre cromóforos vecinos. Todo esto está muy de acuerdo con la estructura propuesta por rayos X, los experimentos de dicroísmo lineal con resolución temporal de BR₄₁₂ y los recientes experimentos de biogénesis de MP y BR (51) (52).

Becher y Casin (53) a partir de la elipticidad molar media por residuo a 223 nm obtenida para MP de $-15,900 \text{ grados cm}^2/\text{dmol}$, utilizando un peso molecular por residuo de 103, un peso molecular para BR de 25.000, un coeficiente de extinción de $63 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 568 nm y unos valores "standard" para las elipticidades de α -hélices y cadenas estadísticas de $-32,600$ y $-2,340 \text{ grados cm}^2/\text{dmol}$ respectivamente, y sin hacer ningún tipo de correcciones, estiman groseramente un contenido en α -hélice en BR del 45%, el mayor obtenido hasta el momento para proteínas de membrana. Estos mismos autores no observan cambios en el espectro de DC que permitiesen suponer alteraciones en las interacciones proteína-proteína, o modificaciones importantes en la estructura secundaria y terciaria durante la fotoisomerización $\text{BR}_{560} \xrightarrow{h\nu} \text{BR}_{570}$, salvo que en BR_{570} (trans-retinal) el retinal está más fuertemente ligado a la proteína y ésta impone sobre él una mayor constricción ausente de simetría, que en BR_{560} .

Desde el punto de vista estructural queda por decir que, Bridgen y Walker (54) obtuvieron un peso molecular para BR de 25.000 ± 1000 mediante equilibrio de sedimentación en 0,1% de SDS, utilizando un volumen específico parcial medido en el mismo medio de 0,691. Estos autores igualmente digieren MP antes y después de reducir con BH_4Na e iluminación con luz visible y -

comparando los mapas peptídicos de estas dos muestras ven que uno de los péptidos había cambiado de movilidad. Después de aislar este péptido, encuentran que hay dos lisinas en su secuencia, de las cuales, sólo una se succinilaba después de la reducción de MP, lo que les lleva a postular que es el péptido donde se liga el retinal a la proteína. Además, por el carácter hidrofílico del péptido y la presencia de prolina en su secuencia, les hace suponer que se trata de una unión entre dos α -hélices que penetran la membrana.

Los aspectos esenciales de la información recogida en diferentes laboratorios (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) durante 1.975-1.976 para el ciclo fotoquímico de BR y su relación con la translocación vectorial de protones se resumen en la figura 4. En general la información de los diferentes grupos coincide, si bien hay algunos aspectos polémicos para los que no se tardará en alcanzar un acuerdo. No es este el lugar para entrar en el análisis del grado de similitud entre el ciclo de BR y el de rodopsina visual, pero sí al menos señalarla, dadas las posibilidades de explotar el sistema BR para un mejor conocimiento del mecanismo de fotorecepción visual y su evolución filogenética.

Lewis y otros (63) detectaron fluorescencia proveniente del complejo púrpura con un máximo de emi

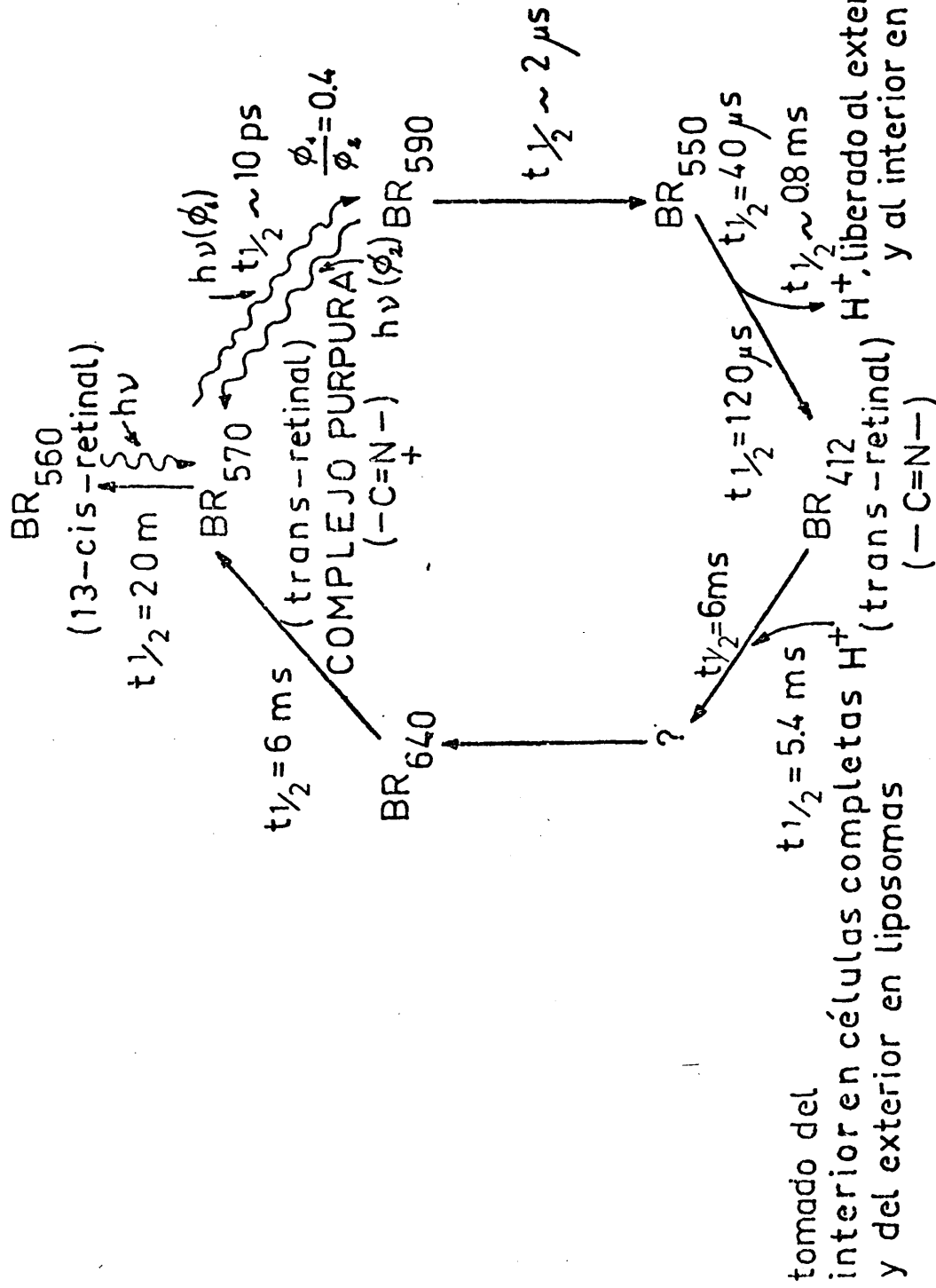


Figura 4.- Ciclo fotoquímico del sistema BR en membranas naturales y en liposomas a temperatura ambiente. Todas las reacciones oscuras (flechas rectas), tienen una energía de activación entre 10 y 20 Kcal./mol.

si3n a 800 nm, un tiempo de vida media de 15 ps a temperatura ambiente y un rendimiento cu3ntico de fluorescencia de 2×10^{-4} , calculando un tiempo de vida radiativo de alrededor de 100 ns. Estos autores postulan - que posiblemente esta fluorescencia proviene del transiente previo a la formaci3n de BR₅₉₀, identificado - provisionalmente como BR₅₈₀ por Kaufman y Col. (61) con un tiempo de vida media de 15 ps.

2.2.2. Estudios funcionales

Pasamos ahora a relacionar brevemente la informaci3n obtenida sobre las funciones de BR en c3lulas completas. Hildebrand y Dencher (64) observan que estas c3lulas presentan una respuesta fotof3bica inversa, es to es, al disminuir la luz en su camino se paran y comienzan a moverse en direcci3n opuesta, y que el espectro de acci3n de esta respuesta coincide con el de BR. Postulan entonces, que BR es el fotoreceptor responsable de esta respuesta que asegura que la c3lula se mantenga en zonas de luz 3til para la bios3ntesis de ATP.

Varios grupos (65) (66) (67) continuan estudiando la s3ntesis de ATP en c3lulas completas y evaluando el gradiente de potencial electroqu3mico de protones (Δp) inducido por la luz y sus dos componentes $\Delta \Psi$ y ΔpH , mediante la utilizaci3n de iones lipof3licos que se distribuyen a ambos lados de la membrana siguiendo este gradiente electroqu3mico.

De especial interés son los experimentos de Lanyi y otros (68) (69) (70), realizados en vesículas de membrana de H.H. En ellos demuestran el acoplamiento de Δp inducido por la luz directamente al transporte activo de iones metálicos y moléculas, sin necesidad de hidrólisis de ATP. Así, primeramente demostraron que la acumulación de leucina en el interior de estas vesículas estaba gobernada por el componente $\Delta\psi$ (interior negativo) del fotopotencial electroquímico, y era dependiente de Na^+ externo a $\text{pH} = 6,5$, por lo que propusieron un mecanismo de cotransporte leucina- Na^+ . Igualmente, postulan que la acumulación en el interior de la vesícula del anión glutamato está acoplada por un mecanismo de cotransporte, a un gradiente de Na^+ (Na^+ fuera/ Na^+ dentro $\gg 1$), generado por un sistema de antitransporte de Na^+ con un catión (por ejemplo H^+) o un cotransporte de Na^+ con un anión (Cl^- ó OH^- por ejemplo), a su vez movidos por el gradiente de potencial electroquímico inducido por iluminación de las vesículas. En un trabajo posterior demuestran, que lo que realmente sucede es que este fotopotencial (Δp) mueve un mecanismo electrogénico de antitransporte H^+/Na^+ ($\text{H}^+/\text{Na}^+ > 1$) que determina la salida de Na^+ hacia el exterior y por tanto la formación de un gradiente de Na^+ (Na^+ fuera/ Na^+ dentro $\gg 1$). Este gradiente postulan que actuaría de sistema de aco

plamiento intermedio entre Δp generado por la luz y otros procesos que requieren energía a nivel de la membrana, como por ejemplo el transporte activo de glutamato.

Terminamos por último esta exposición sobre los antecedentes del sistema BR, con una revisión de los experimentos realizados en los dos últimos años en modelos de membrana.

Lozier y otros (70) utilizando dos modelos cerrados de membrana, uno natural, las vesículas de membrana celular de H.H. y otro sintético, liposomas con BR, modelos en los que BR está opuestamente orientada en la membrana en uno con respecto del otro, demuestran que la liberación de H^+ sucede en el lado extracelular y la toma de H^+ en el lado citoplasmático. Igualmente ven que la acidificación del medio en vesículas de membrana de H.H. tiene un $t_{1/2}$ de aparición menor de 1 ms. al igual que en MP aislada en agua, y que la alcalinización en el medio de liposomas con BR tiene un $t_{1/2}$ de 10 ms. comparable al de MP aislada en agua. Estos fenómenos que en MP aislada relajan en la zona del ms. siguiendo una doble exponencial, en los modelos de membrana estudiados no relajan completamente hasta pasados varios segundos y todavía no están satisfactoriamente interpretados.

Tres trabajos (72) (73) (74) han aparecido

confirmando y extendiendo los trabajos originales del grupo de Skulachev en bicapas planas con BR. En todos ellos se hace un intento de resolver temporalmente la aparición de fotocorrientes y fotopotenciales medidos directamente, pero en ninguno se llega a una resolución temporal suficientemente grande como para ligar estas medidas fotoelectroquímicas a lo que hoy ya se sabe del ciclo fotoquímico de BR.

2.3. ATRACTIVO DE MP DE H.H. COMO MATERIAL PARA ESTUDIOS QUIMICO-FISICOS

Terminamos esta relación de antecedentes con una relación de las ventajas que presentan MP y el sistema BR para estudios químico-físicos sobre proteínas de membrana, fototransducción de energía y fotorecepción (visión), ventajas que ya hemos visto implícitamente anteriormente y que ahora recogemos explícitamente con el fin de justificar la selección de este material.

a) La fuente biológica del sistema es barata y abundante, y las técnicas preparativas son mínimas. El H.H., como halófila que es, requiere alta concentración de ClNa en el medio de cultivo, lo que hace que no tengamos problemas de contaminación ni de esterilización. Igualmente dado que la preparación de MP es muy sencilla y que BR es la única proteína de MP, la preparación del sistema de trabajo es poco exigente, como se requie

re en un laboratorio no bioquímico como el nuestro.

b) Estructuralmente, dado que BR está formando una red cristalina en MP, presenta la singularidad de que - además de los métodos tradicionales de química-física de proteínas en solución que son los únicos utilizables por el momento para la mayoría de proteínas de membrana, es especialmente susceptible de caracterización estructural en la propia MP por métodos de difracción. Es to ha hecho que sea la proteína de membrana para la que se conoce su estructura con más resolución (7 \AA). Además su tamaño es relativamente pequeño y su grado de - desnaturalización o renaturalización se puede seguir con criterios estructurales (características espectroscópicas del complejo púrpura) además de funcionales (fototranslocación vectorial de protones).

c) Funcionalmente, el sistema BR es muy sencillo - si lo comparamos con el sistema fotosintético de clorofila , o el sistema fotoreceptor de rodopsina visual, y esta función se puede reproducir con facilidad en modelos de membrana químicofísicamente bien definidos. Como hemos visto anteriormente, el sistema BR transforma directamente energía luminosa en energía electroquímica - potencial. Por otro lado, se incorpora con gran facilidad a todos los tipos de modelos de membrana existentes, lo que va a permitir utilizar la mayoría de las técnicas disponibles y por tanto estudiar la mayor parte de

los problemas funcionales a diferentes niveles de complejidad.

d) Otras ventajas son: 1) La posibilidad de que - con los mismos estudios avanzar en campos íntimamente .. ligados hoy frontera en la bioquímica física, la estructura de proteínas de membrana, la interconversión de - formas de energía en interfases biológicas (concretamente fotosíntesis) y el reconocimiento de señales por receptores (concretamente fotorecepción); 2) El ciclo fotoquímico de BR es termoreversible, lo que supone - una gran ventaja desde el punto de vista experimental, sólo apreciada en toda su extensión por aquellos que - trabajan con rodopsina visual; 3) Las suspensiones de MP y modelos esféricos de membrana con BR son ópticamente aceptables y sus cromóforos (aminoácidos aromáticos y complejo púrpura) están espectralmente bien separados; 4) El gran interés actualmente en distintos laboratorios de muy distinta naturaleza por la dilucidación de la estructura y función de este sistema BR.

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO DE LA PRESENTE TESIS

Como hemos visto en la introducción, la unión de átomos y moléculas relativamente sencillos desarrollada por la naturaleza en estructuras altamente organizadas, permiten modos de reacción de extraordinaria especificidad y eficiencia. Así por ejemplo, en membra

En las fotosintéticas hemos visto que suceden acoplada-
mente fenómenos tales como: absorción de luz, transfe-
rencia de electrones, separación de cargas y los con-
siguientes cambios de potencial eléctrico, flujo de -
iones y síntesis de ATP. La base de todos estos fenó-
menos es la dinámica molecular de la estructura en -
cuestión.

Siguiendo a Witt (13), cada problema en bio-
química-física, esto es, el conocimiento de la dinámi-
ca molecular de un sistema biológico cualquiera, tiene
que ser atacado desde cuatro ángulos distintos:

a) Fenómenos macroscópicos. Los numerosos ciclos
funcionales de la maquinaria molecular, todavía desco-
nocida, se hacen aparentes mediante fenómenos observa-
bles a nivel macroscópico.

b) Organización estructural. El conocimiento so-
bre la naturaleza química de los distintos componentes
que forman la estructura del sistema en cuestión, así
como su localización en el espacio y en función del -
tiempo, es una etapa ineludible para llegar al conoci-
miento de la dinámica molecular de un sistema funcio-
nal.

c) Hipótesis. Esta es una etapa en el desarrollo
de cualquier conocimiento científico altamente benefi-
ciosa para ordenar, correlacionar e interpretar los -
datos experimentales existentes sobre el objeto de es

tudio, así como para determinar el curso posterior de acción. Como explicaciones provisionales que son, las hipótesis implican la necesidad de buscar evidencias ulteriores.

d) Fenómenos moleculares. Es evidente que la información más inmediata sobre la dinámica molecular responsable de la función de un sistema biológico es aquella obtenida a partir de medidas más o menos directas de los acontecimientos moleculares. Con frecuencia, sin embargo, es la etapa en la que se encuentran más dificultades, por las limitaciones inherentes a muchas de las técnicas cuando se aplican al estudio de la dinámica molecular de cada uno de los componentes en la estructura nativa, esto es, aquella que todavía guarda las características funcionales del sistema biológico original. En este sentido, los modelos, sistemas químico-físicamente más sencillos y mejor definidos, son de especial interés como ya vimos anteriormente al hablar de modelos de membrana.

La tesis general es por tanto que la dinámica molecular de BR en MP, y por tanto su actividad fototranslocadora de protones, su actividad fotosensora y otras posibles funciones que se le pudiesen atribuir en el futuro, se basan como las demás propiedades macroscópicas de MP y BR, en sus características estructurales y en las consecuencias que perturbaciones químicas o físicas, particularmente absorción de luz, tienen sobre estas propiedades

estructurales.

Vistos los antecedentes al tema objeto de la presente tesis y señalados los posibles niveles de estudio a utilizar, contamos nos sea fácil el esquematizar nuestros objetivos y plan de trabajo.

3.1 OBJETIVOS

Si tenemos en cuenta la información existente hasta 1.974 sobre MP y BR, fecha en que se empezó esta tesis, vemos que había discrepancias sobre algunos datos analíticos, se carecía de un estudio de solubilización y segregación de los componentes de MP, por tanto no se podía hacer ningún estudio con métodos químicofísicos - sobre tamaño, forma y peso molecular de BR en solución, no se tenía información sobre la topografía de BR en la membrana ni sobre su polaridad, y prácticamente no se había hecho aún ningún intento de estudio estructural - de BR en modelos de membrana.

Si bien nos hubiese gustado estar ya en disposición de hacer estudios sobre fenómenos moleculares en MP y BR relacionados con su función fototranslocadora - de protones, nuestro laboratorio no estaba todavía dispuesto para ello y sí lo estaba para hacer estudios estructurales, etapa ineludible al fin y al cabo para llegar al conocimiento de la dinámica molecular de un sistema funcional, como vimos anteriormente. Por ello se decidió que el presente trabajo fuese fundamentalmente

estructural y los objetivos que nos señalamos fueron los siguientes.

a) Mejorar el conocimiento de algunas propiedades macroscópicas y de composición química de MP y BR.

b) Conocer el proceso de solubilización y segregación de los componentes de MP en agua mediante detergentes y la solubilización de BR en agua libre de detergentes.

c) Caracterizar el tamaño, forma y peso molecular de BR libre de lípidos en solución acuosa con y sin detergentes.

d) Obtener información sobre topografía y polaridad de BR en MP.

e) Caracterizar estructuralmente BR en modelos de membrana a los que se había incorporado.

f) Mejorar el modelo de MP y BR existente en la actualidad.

Para tratar de alcanzar estos objetivos nos hicimos el siguiente plan de trabajo.

4.2. PLAN DE TRABAJO.

a) Propiedades macroscópicas de MP

- densidad en agua
- contenido en proteína, lípidos, fósforo y retinal
- coeficientes de extinción de BR en distintas condiciones y longitudes de onda.

b) Solubilización de MP y BR en soluciones acuosas con y sin detergentes.

- isoterms de unión MP-detergente mediante centrifugación diferencial.
- isoterms de unión detergente-MP, -lípidos de MP y -BR en agua mediante calorimetría.
- segregación lípido-proteína con detergentes - mediante centrifugación en gradientes de densidad.

c) Tamaño, forma y peso molecular de BR en agua con y sin detergentes.

- caracterización hidrodinámica, coeficientes de sedimentación y difusión.
- volumen específico parcial.
- equilibrio de sedimentación.

d) Topografía y polaridad de BR en MP.

- digestión con proteasas de BR de MP aisladas, MP fotolizadas, MP en células completas y BR en agua libre de detergentes.
- caracterización de los productos solubles y - particulados de digestión.

e) Estructura de BR en modelos esféricos de membrana

- caracterización química, morfología, hidrodinámica y espectroscópica.

f) Contribución de estos estudios al perfeccionamiento del modelo estructural existente en la actualidad.

4. INVESTIGACIONES FUTURAS SOBRE EL TEMA

Después de ver la información ya existente sobre estructura y función de MP y BR, recogida en sección 2 de este capítulo, no es difícil el preveer en qué aspectos se va a poner más interés en los próximos años, y sobre todo, no es difícil el relatar qué aspectos se nos presentan como más atractivos para nosotros. Esto es lo que vamos a esquematizar a continuación:

a) Estructura de MP y modelos de membrana con BR.

- estudios por difracción, mejorando la resolución y el análisis de resultados de modo que permitan obtener un modelo más de acuerdo con todos los datos experimentales existentes. Uno de los aspectos críticos en el modelo actual es la falta de reconocimiento de polaridad de BR en MP.
- estudio ulterior del tamaño, forma, orientación y comportamiento hidrodinámico de BR en membrana y en solución, mediante métodos hidrodinámicos de equilibrio, ópticos, y aquellos basados en la carga y distribución de carga. Nos referimos por ejemplo a la determinación de la orientación de retinal con respecto al plano de la membrana, mediante dicroismo lineal en membranas orientadas, o a la determinación del tiempo de difusión rotacional de

BR en distintas preparaciones mediante diacrisis lineal con resolución temporal, o a la determinación de grupos ionizables accesibles al agua durante la fotólisis, o a la caracterización de la polimerización de BR libre de lípidos en agua etc.etc.

- estudio del comportamiento superficial de BR en monocapas y bicapas. Así, la determinación del área de BR o la regeneración del complejo púrpura en monocapas puras, la formación de bicapas planas libres de solventes orgánicos a partir de dos monocapas con BR, la topografía y polaridad de BR en liposomas mediante digestión proteolítica y fotólisis en presencia de NH_2OH etc.etc.

b) Mecanismos de fototranslocación de protones en membranas con el sistema BR.

- estudios mediante métodos fotoelectroquímicos de la generación de fotocorrientes y fotopotenciales en bicapas planas con BR. Comprendiendo el análisis de las variables determinantes de fotocorrientes y fotopotenciales tales como pH, asimetría y concentración de iones, potencial de membrana etc., el análisis cinético con resolución temporal no peor de 1 ms. etc. etc.
- caracterización ulterior de especies transientes generadas por fotólisis de BR y su implicación en

el mecanismo de translocación vectorial de protones mediante espectroscopía de adsorción y emisión. Aquí aspectos tales como, la correlación - del grado de cristalinidad e integridad de BR con la eficiencia cuántica de translocación de protones, o la caracterización estructural de los distintos transientes generados por fotólisis mediante fluorescencia y polarización de fluorescencia, la caracterización del primer estado excitado de BR, la determinación del pK de posibles grupos ionizables implicados en la translocación de H^+ en las distintas especies transientes, etc. etc., - son todos ellos de gran trascendencia.

Contamos con que este capítulo de introducción, antecedentes y planteamiento de la presente tesis, que no hemos sabido hacer más corto a pesar de nuestros propósitos, sea de utilidad a los posibles lectores interesados en el tema y a nosotros a la hora de discutir nuestros resultados y de perfilar las conclusiones que se derivan de los mismos.

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) BANGHAN, A.D., HILL, M.V. y MILLER, N.G.A/
Methods in Membrane Biology (E.D. Korn), vol. 1.
Plenum Press. New York (1.974) p. 1.

- (2) FETTIPLANE, R., GORDON, L.G.M., HLADKY, S.B,
REQUENA, J., ZINGSHEIM, H.P. y HAYDON, D.A.
Methodos in Membrane Biology (E.D. Korn). vol. 4
Plenun Press. New York, (1.974), p. 1.
- (3) CADENHEAD, D.A.
Recent. Prof. Surface Sci., 3, 169 (1.970)
- (4) TANTORD, CH. y REYNOLDS, J.A.
Biochim. Biophys. Acta, 457, 133 (1.976)
- (5) MONTAL, M.
Aun. Rev. Biophys. Bioeng., 5, 119 (1.976)
- (6) ROTHFIELD, L.I. y FRIED, V.A.
Methods in Membrane Biology (E.D. korn) vol. 4,
Plenun Press. New York, (1.974) p. 277
- (7) ERLANGER., B.F.
Aun. Rev. Biochem., 45, 267 (1.976)
- (8) MENDER, E.L. (Ed).
Special Issue on the Chemistry of vision. Acc.
Chem. Res. 8, 81 (1.975)
- (9) LEWIS, M.S., KRIEG, L.C. y KIRK, W.D.
Exp. Eye. Res., 18, 29 (1.974)
- (10) ROSENFELD, T., ALCHALEL, A. y OTTOLENGHI, M.
Photochem. Photobiol., 20, 121 (1.974)
- (11) PARSON, W.W.
Aun. Rev. Microbiol., 28, 41 (1.974)
- (12) BEARDEN, A.J. y MALKIN, R.
Quart. Rev. Biophys., 7, 131 (1.975)
- (13) WITT, H.T.
Quart. Rev. Biophys., 4, 365 (1.971)
- (14) JUNGE, W.
Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.
(T.W. Goodwin. Ed), 2nd ed. vol. 2, Academic Press.
Londres, (1.976), p. 233.
- (15) BEDDARD, G.
Nature, 263, 569 (1.976)

- (16) BOYER, P.D.
Tibs., 2, 38 (1.977)
- (17) MITCHELL, P.
B. Soc. Trans., 4, 399 (1.976)
- (18) CHERRY, R.J.
Biological Membranes (Chapman, D.; Wallachs. D.F.M. Eds), vol. 3, Academic. Press., Londres (1.976)
p. 47.
- (19) STRAVS, G.
Photochem. Photobiol., 24, 141 (1.976)
- (20) TIEN, H.T.
Bilayer Lipid Membranes, Theory and Practice, Marcel Dekker, New York, (1.974), p. 99.
- (21) MONTAL, M. y MULLER, P.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3561 (1.972)
- (22) LARSEN, H.
Adv. Microbiol. Physiol., 1, 97 (1.967)
- (23) OESTERHELT, D. y STOECKENIUS, W.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2853 (1.973)
- (24) STOECKENIUS, W. y ROWEN, R.
J. Cell. Biol., 34, 365 (1.967)
- (25) STOECKENIUS, W. y KUNAN, W.H.
J. Cell. Biol. 38, 337 (1.968)
- (26) OESTERHELT, D. y STOECKENIUS, W.
Nature, New. Biology, 233, 149 (1.971)
- (27) BLAUROCK, A.E. y STOECKENIUS, W.
Nature. New Biology, 233, 152 (1.971)
- (28) MENDELSON, R.
Nature, 243, 22 (1.973)
- (29) OESTERHELT, D. y HESS, B.
Eur. J. Biochem., 37, 316 (1.973)
- (30) OESTERHELT, D. y KRIPPAHL, G.
FEBS.Letters., 36, 72 (1.973)

- (31) NAQVI, K.R., GONZALEZ RODRIGUEZ, J., CHERRY, L.J.
y CHAPMAN, D.
Nature New Biology, 245, 249 (1.973)
- (32) CONE, R.A.
Nature, New Biology, 236, 39 (1.972)
- (33) DANON, A. y STOECKENIUS, W.
Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 1234 (1.974)
- (34) RACKER, E. y STOECKENIUS, W.
J. Biol. Chem., 249, 662 (1.974)
- (35) RACKER, E. y HINKLE, P.
J. Membrane Biol., 17, 181 (1.974)
- (36) OESTERHELT, D., SCHUHMANN, L. y GRUBER, H.
FEBS Letters, 44, 257 (1.974)
- (37) OESTERHELT, D. y SCHUHMANN, L.
FEBS Letters, 44, 262 (1.974)
- (38) STOECKENIUS, W. y LOZIER, R.H.
J. Supramol. Struct., 2, 769 (1.974)
- (39) LEWIS, A, SPOONHOWER, J., BOFOMOLNI, R.A., LOZIER,
R.H. y STOECKENIUS, W.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4462 (1.974)
- (40) KAYUSHIN, L.P. y SKULACHEV, V.P.
FEBS Letters., 39, 39 (1.974)
- (41) DRACHEV, L.A., KAULEN, A.D. OSTRUMOV, S.A. y
SKULACHEV, V.P.
FEBS Letters, 39, 43 (1.974)
- (42) DRACHEV, L.A., JASAITIS, A.A., KAULEN, A.D.,
KONDRASHIN, A.A., LIBERMAN, E.A., NEMECEK, I.B.
OSTRUMOV, S.A., SEMENOV, A. y SKULACHEN, V.P.
Nature, 249, 321 (1.974)
- (43) JAN, L.Y
Visión Res., 15, 1081 (1.975)
- (44) CHIGNELL, C.F. y CHIGNELL, D. A.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 62, 136 (1.975)

- (45) BLAUROCK, A.E.
J. Mol. Biol., 93, 139 (1.975)
- (46) HENDERSON, R.
J. Mol. Biol., 93, 123 (1.975)
- (47) HENDERSON, R. y UNWIN, P.M.T.
Nature, 257, 28 (1.975)
- (48) HEYN, M.P., BANER, P.J. y DENCHER, N.A.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 67, 897, (1.975)
- (49) BANER, P.J., DENCHER, N.A. y HEYN, M.P.
Biophys. Struct. Mechanism., 2, 79, (1.976)
- (50) BECHER, B. y EBREY, T.G.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 69, 1, (1.976)
- (51) SUMPER, M., REITMEIER, H. y OESTERHELT, D.
Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 15, 187 (1.976)
- (52) SUMPER, M. y HERRMANN, G.
FEBS Letters, 69, 149 (1.976)
- (53) BECHER, B. y CASSIN, J.V.
Biophys. J., 16, 1183 (1.976)
- (54) BRIDGEN, J. y WALKER, I.D.
Biochemistry, 15, 792 (1.976)
- (55) KUNG, M.C., DEVAULT, D., HESS, D. y OESTERHELT, D.
Biophys. J., 15, 907 (1.975)
- (56) CHANCE, B., PORTE, M., HESS, B. y OESTERHELT, D.
Biophys., J., 15, 913 (1.975)
- (57) LOZIER, R., BOFOMOLNI, R. y STOECKENIUS, W.
Biophys. J., 15, 955 (1.975)
- (58) DENCHER, N. y WILMS, M.
Biophys. Struct. Mechanism. 1, 259 (1.975)
- (59) SHERMAN, W.V., SLIFKIN, M.A. y CAPLAN, S.R.
Biochim. Biophys. Acta., 423, 238 (1.976)
- (60) SHERMAN, W.V., KORENSTEIN, R. y CAPLAN, S.R.
Biochim. Biophys. Acta, 430, 454 (1.976)
- (61) KAUFMAN, K.J., RENTZEPIS, P.M., STOECKENIUS, W.
y LEWIS, A/
Biochem. Biophys, Res. Comm., 68, 1109 (1.976)

- (62) GOLDSCHMIDT, C.R., OTTOLENGHI, M. y KORENSTEIN, R.
Biophys, J., 16, 839 (1.976)
- (63) HIRSCH, M., MARCUS, M.A., LEWIS, A., MAHR, H. y
FRIGO, N.
Biophys, J., 16, 1399 (1976)
- (64) HILDEBRAND, E. y DENCHER, N.
Nature, 257, 46 (1.975)
- (65) MICHEL, H. y OESTERHELT, D.
FEBS, Letters, 65, 175 (1.976)
- (66) DANON, A. y CAPLAN, S.R.
Biochim. Biophys. Acta, 423, 133 (1.976)
- (67) BAKKER, E.P., ROTTEMBERG, H. y CAPLAN, S.R.
Biochim. Biophys. Acta 440, 557 (1.976)
- (68) MACDONALD, R.E. y LANYI, J.K.
Biochemistry, 14, 2882 (1.975)
- (69) LANYI, J.K., RENTHAL, R. y MACDONALD, R.E.
Biochemistry, 15, 1603 (1.976)
- (70) LOZIER, R.H., NIEDERBERGER, W., BOFOMOLNI, R.A.,
HWANG, S. y STOECKENIUS, W.
Biochim. Biophys. Acta 440, 545 (1.976)
- (71) EISENBACH, M., BAKKER, E.P., KORENSTEIN, R. y
CAPLAN, S.R.
FEBS Letters, 71, 228 (1.976)
- (72) HERRMANN, T.R. y RAYFIELD, G.W.
Biochim. Biophys. Acta, 443, 623 (1.976)
- (73) SHIEH, P. y PACKER, L.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 71, 603 (1.976)
- (74) DANCSHAZY, Z. y KARVALY, B.
FEBS. Letters, 72, 136 (1.976)

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

2.1. METODOS PREPARATIVOS DEL MATERIAL DE ESTUDIO

2.1.1. Cultivo de Halobacterium Halobium (H.H.)

2.1.1.1. Procedencia y tipo de cepas de H.H.

La cepa de H.H. empleada en este trabajo ha sido la mutante R_1M_1 , la cual está exenta de vacuolas gaseosas que impiden una total separación de las fracciones roja y púrpura (1) y no sintetiza bacterioruberina. Esta cepa fue facilitada por el Dr. Oesterhelt, a quien expresamos aquí nuestro agradecimiento.

2.1.1.2. Condiciones de cultivo

Esquemáticamente seguimos el procedimiento de Oesterhelt y Stoeckenius con ligeras modificaciones (1) - (2) (3).

En un principio empleamos un incubador con agitación (New Brunswick Scientific Co. Inc.), manteniendo 110 rpm. durante las primeras 48 h. y bajando a 90 rpm. hasta el final del crecimiento. La iluminación se mantuvo con cuatro lámparas de tungsteno de 100 W, c.u., colocadas en la ventana del incubador. Durante todo el proceso la temperatura osciló entre 36-38° C. Utilizamos doce erlenmeyer de 2 l. con 700 ml. de medio de cultivo cada uno de ellos.

El crecimiento del cultivo se siguió determinando la absorbancia a 660 nm., dando por finalizado éste 24 h. después de alcanzar la fase estacionaria. La duración

media de un cultivo era de 7 días y el máximo valor de absorbancia alcanzado fue de 0,325 (figura 1). El rendimiento medio en MP, por 9 l. de cultivo era de 50 ± 7 mg. de peso seco de MP.

Con objeto de conseguir un mayor rendimiento, con el consiguiente ahorro de tiempo en los trabajos preparativos, se construyó en los talleres del Instituto "Rocasolano" un fermentador diseñado por el Dr. D. J. L. Saiz en el que se analizaron las condiciones óptimas para el crecimiento del H.H. y síntesis de MP. Esquemáticamente aparece diseñado en la figura 2. Toda la parte de vidrio es pirex y consta esencialmente de los siguientes elementos:

- Un reactor de vidrio cilíndrico de 10 l. de capacidad, con boca ancha de cierre plano con un serpentín interior de vidrio para circulación de agua de refrigeración de 10 m. de longitud y 11 mm. de diámetro.

- En el interior lleva encapsulados en vidrio cuatro tubos fluorescentes de 6 W de potencia c.u.

- Rodeando al reactor hay 10 tubos fluorescentes circulares de 32 W de potencia c.u.

- El medio de cultivo se homogeneiza continuamente con un agitador magnético.

- En la boca del reactor hay entradas para el agua de refrigeración, tubo de aireación, termómetro y sonda de control de temperatura. Todo este conjunto está -

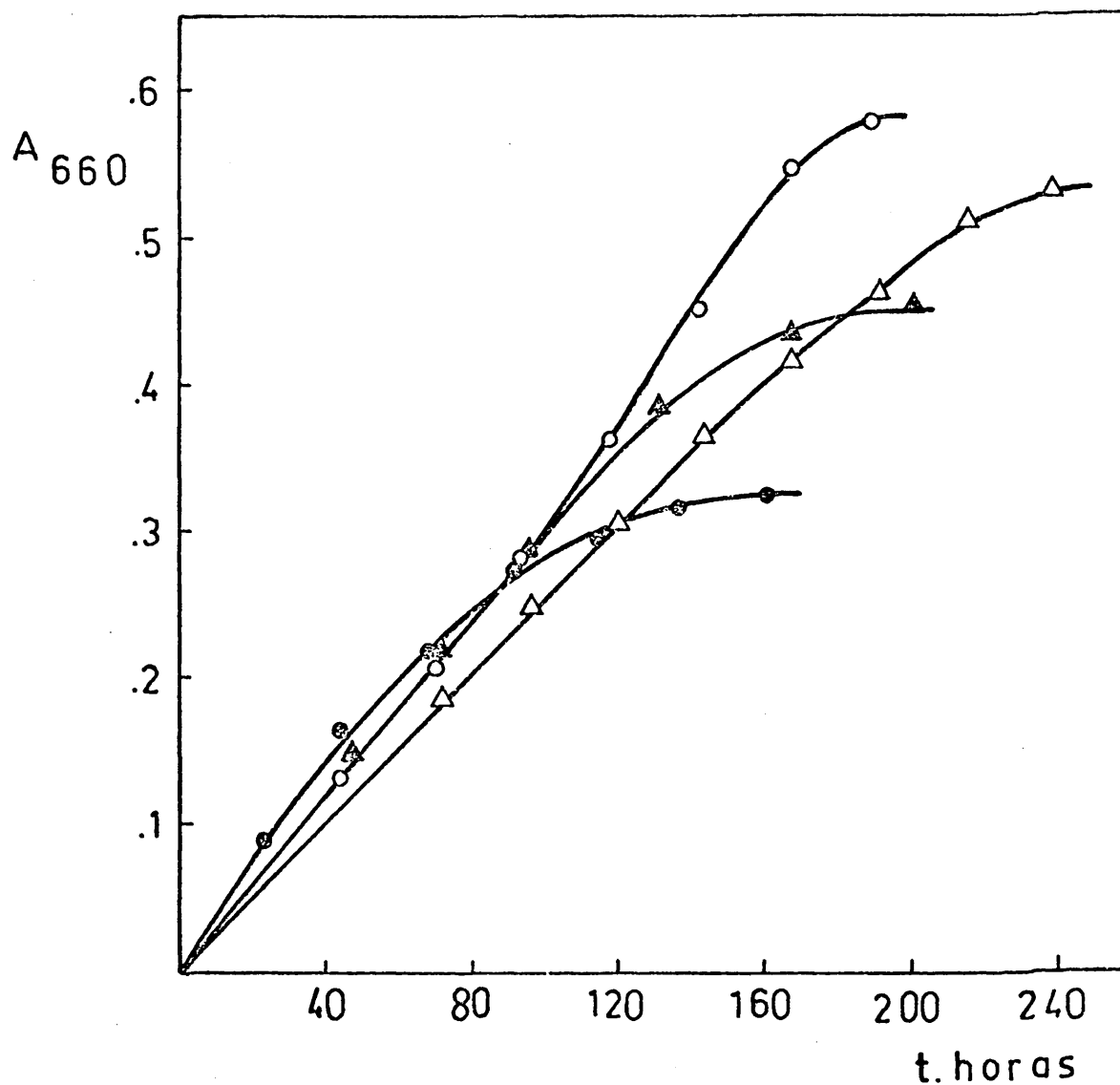


Figura 1.- Curva de crecimiento del H.H. (R_1M_1) en fermentador con agitación (—●—); y en fermentador estático con un Δ presión de aire de 10 cm. Hg (—▲—), 6 cm. Hg (—△—) y 10 cm. Hg durante las primeras 120 h. y 6 cm. Hg hasta el final (—○—).

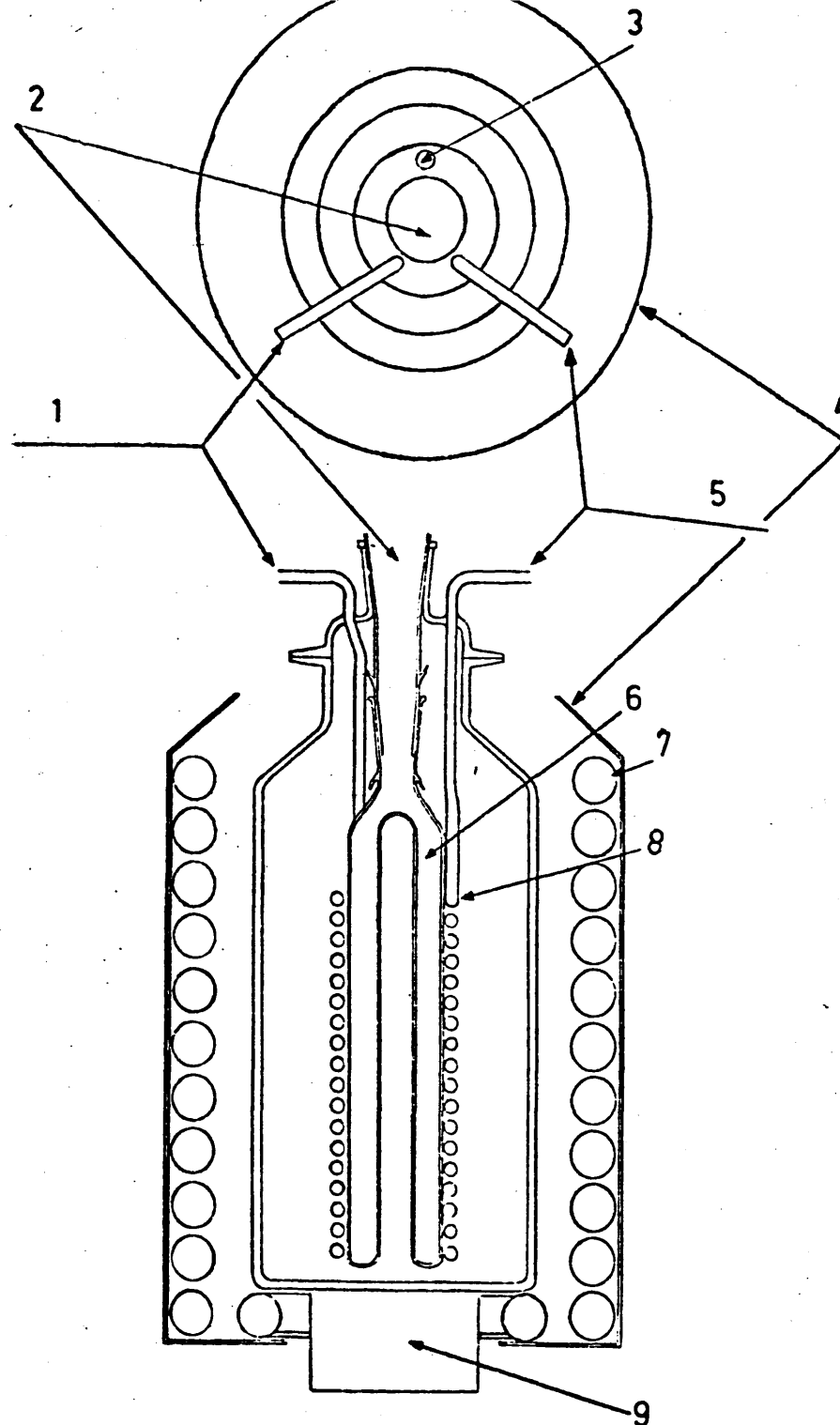


Figura 2.- Esquema del fermentador estático: 1, salida de agua. 2, entrada de conexiones eléctricas. 3, entrada de aire comprimido y sonda de control de temperatura. 4, envuelta reflectora. 5, entrada de agua. 6, tubos fluorescentes internos. 7, tubos fluorescentes externos. 8, serpentín de refrigeración. 9, agitador magnético.

encerrado en un reflector cilíndrico que proyecta toda la luz de los tubos fluorescentes hacia el reactor.

- El agua de refrigeración procede de un termostato que mantiene a $37 \pm 0,5^{\circ}$ C. la temperatura en el interior del fermentador.

- La aireación se mantiene con una aguja de acero inoxidable de 2 mm. de diámetro interno que llega al - fondo del fermentador, a través de la cual inyectamos una corriente continua de aire, que controlamos mediante una llave de paso, midiendo la diferencia de presión que ejerce sobre un manómetro de mercurio. Experimentalmente determinamos las condiciones óptimas para un crecimiento máximo.

La duración media de un cultivo ha sido de 9 días, llegando alcanzar en la fase estacionaria a 660 nm. una absorbancia de 0,58 (figura 1) y un rendimiento de MP de 145 ± 10 mg.

2.1.1.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado contiene por l.:
ClNa, 250 g.; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 g.; citrato trisódico, $2 \text{H}_2\text{O}$, 3 g.; ClK, 2 g.; Bacto-Peptona Bacteriological Technical (Difco 0885-02, Difco Laboratories, Detroit, (Michigan), 10 g. Con NaOH 2N se ajusta el pH a 7,2. Se hierve durante 10 min. se filtra a través de papel de filtro y se mantiene a baja temperatura hasta su utili-

zación.

Al tener una única cepa de H.H. en el laboratorio y sabiendo que sólo las halófilas obligadas pueden vivir en este medio, no es necesario trabajar en condiciones estériles.

Cuando se deseó preparar membrana marrón (MM), al medio de cultivo se añadió nicotina, 10^{-3} M, que es un inhibidor de una de las etapas finales de la biosíntesis de retinal (4).

2.1.1.4. Mantenimiento de cepas de H.H.

El mismo medio de cultivo, conteniendo 1,8% de Bacto-Agar (Laboratorios Difco) se esteriliza a 120° C. durante 30 min. y en caliente se transfiere a tubos de ensayo de 20 x 4 cm., hasta la mitad de su capacidad aproximadamente. Estos se colocan con una inclinación de unos 30°, y una vez solidificado el agar y en condiciones asépticas se siembran con las células del tubo patrón anterior. Se incuban en idénticas condiciones de luz y temperatura que los cultivos y una vez crecidos se guardan a baja temperatura (2 á 4° C.).

Uno de estos tubos, previamente señalado como patrón, se reserva para inocular la próxima siembra sobre agar, generalmente cada 3 ó 4 meses, asegurando así el mantenimiento de la pureza de la cepa.

2.1.2. Fraccionamiento subcelular

2.1.2.1. Preparación de membrana púrpura

Todas las operaciones se realizan a baja temperatura. Las células del medio de cultivo se recogen - centrifugando a 13.000 xg durante 20 min. y a 4° C. Los pellets se resuspenden en 100 ml. de ClNa 4M a los que se agregan 5 mg. de DNasa (Actividad aproximadamente 1400 unidades Kunitz por mg. de proteína. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri). Se ponen a dializar frente a 5 l. de agua destilada, cambiando ésta a las 3 ó 4 h. de iniciada la diálisis y continuando ésta durante - una noche. El choque osmótico lisa las células y la DNasa previene la formación de alta viscosidad como consecuencia de la liberación de ADN.

El lisado, de un color rojo púrpura, se centrifuga durante 10 min. a 10.000 xg con objeto de eliminar cualquier suciedad acumulada. Se descarta el precipitado y el sobrenadante se centrifuga a 50.000 xg durante 30 min. El sobrenadante rojo anaranjado se descarta y el - precipitado púrpura se resuspende en ClNa 4M, se homogeneiza totalmente y se centrifuga en idénticas condiciones. Se repiten de idéntica forma dos lavados más, uno con ClNa 0,1 M y otro con agua destilada, hasta que el sobrenadante queda totalmente claro. En estos lavados se elimina toda la fracción soluble celular y parte de membranas rojas. Finalmente, los precipitados se resuspenden en agua destilada y se someten a fraccionamiento

en gradientes de sacarosa.

Se emplearon dos tipos de gradientes: a) dis continuos, formados por capas manualmente superpuestas de sacarosa 1,5, 1,4, 1,3 y 1,2 M, con un volumen de - 5:9:9:9 ml. respectivamate; b) continuos, formados linealmente con sacarosa 1,5 y 1,2 M. Sobre ellos se depositan fracciones de 2 á 3 ml. de suspensiones de membranas.

Para estos gradientes se utilizaron o bien - un rotor angular 50 de 8 x 35 ml., centrifugando a 150.000 xg o un SW25 de 6 x 36 ml., centrifugando a - 85.000 xg durante 16 - 20 h.

La banda de membrana púrpura (MP) aparece en la interfase 1,4 - 1,3 M de sacarosa, mientras que la fracción roja (MR) aparece en la interfase agua - 1,2M (figura 3). A veces hemos observado en la fracción púrpura una subdivisión con dos bandas, una de ellas de - mayor densidad. Aisladas separadamente no han aparecido entre ellas diferencias espectrales. Parece ser (2) que la banda más densa aparece cuando la sacarosa empleada no es ultrapura.

Las fracciones MR y MP se recogen separadamente y se guardan a baja temperatura, bien en suspensión en sacarosa o se lavan con agua y se liofilizan previamente.

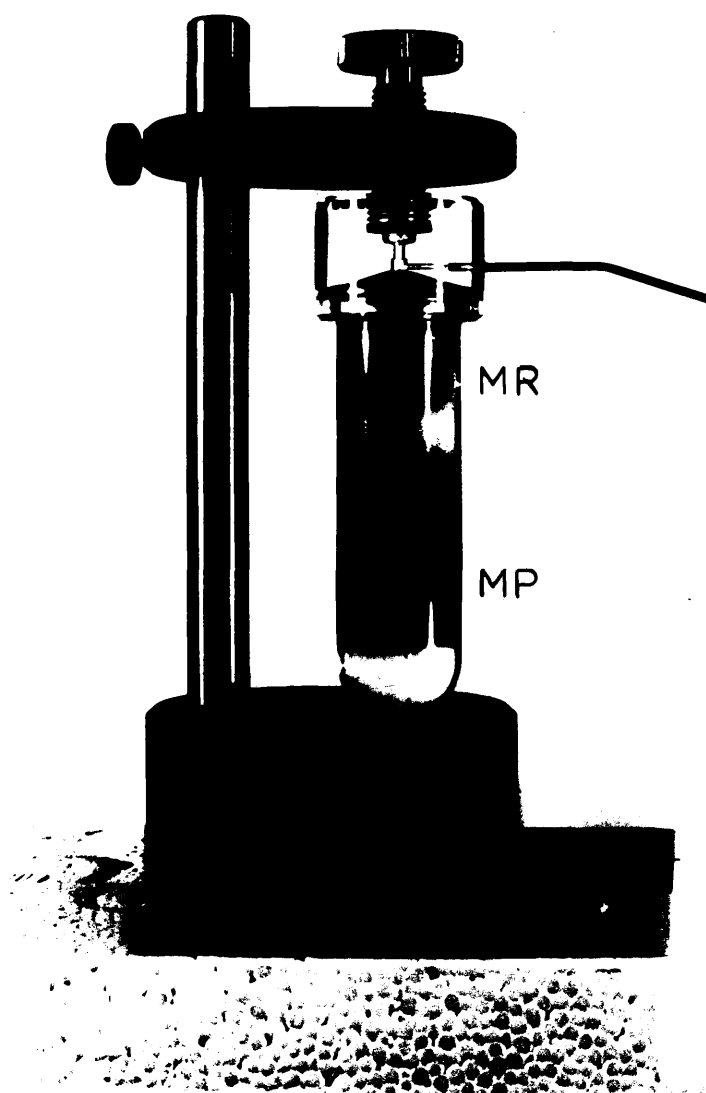


Figura 3.- Fraccionamiento de membranas de H.H. en un gradiente discontinuo de sacarosa. Banda superior MR; banda inferior MP.

La eliminación de sacarosa se consigue mediante diálisis exhaustiva o con varios lavados con agua destilada diluyendo al menos tres veces y centrifugando a 100.000 xg durante 1 h. Son necesarios como mínimo tres lavados.

2.1.2.2. Preparación de membrana marrón

Utilizando gradientes continuos de sacarosa - 25-45% (p/p) y operando de la forma ya reseñada, conseguimos separar una tercera fracción de membranas de color marrón (MM) que aparece entre las fracciones roja y púrpura. Esta fracción es cuantitativamente insignificante en las condiciones de cultivo descritas, (ya que el objetivo que se busca con ellas, es conseguir la máxima cantidad de MP, por tanto empleamos aquellas condiciones que favorezcan su síntesis), pero se hace abundante cuando el medio de cultivo contiene 10^{-3} M de nicotina. En este caso cuando el crecimiento está próximo a llegar a la fase estacionaria se interrumpe y las células se recogen según (2.1.2.1.), se lavan con medio salino basal (medio de cultivo sin peptona), y se continua durante 16 h. el cultivo de las células libres de nicotina en medio basal suplementado con un aminoácido (4). De este modo se obtiene una membrana marrón conteniendo BR (MM_{BR}).

2.1.2.3. Preparación de vesículas de membrana de H.H.

Hemos seguido fundamentalmente el procedimiento de Kanner y otros (5). Partimos de 2,5 l. de cultivo recogido éste 24 h. después de alcanzada la fase estacionaria. Las células se recogen de la forma ya reseñada - lavándolas con el medio salino basal (medio de cultivo sin peptona). Sonicando en porciones de 30 ml. durante 2 min. y en baño de hielo, los segmentos de membrana plasmática, formados se cierran sobre sí mismos formando vesículas, que se separan de las células enteras centrifugando a 13.000 xg durante 15 min. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 133.000 xg durante 45 min., - el pellet se lava con ClNa 4M y se centrifuga en idénticas condiciones. Finalmente, las vesículas se suspenden en ClNa 4M y almacenadas a 4° C. son estables durante - varios meses.

2.1.3. Extracción de lípidos de MP y solubilización de BR en soluciones acuosas mediante detergentes

Hemos utilizado dos métodos para la delipidación de MP, uno de ellos utilizando disolventes orgánicos y el otro solubilizando las membranas con SDS y pasando por columna de sephadex G-100.

Para la extracción con solventes orgánicos hemos seguido fundamentalmente el método de Bligh y Dyer (6). El contenido de MP en la suspensión a delipidar ha

oscilado entre 2 y 4% (P/V). La mezcla de extracción se centrifugó a 10.000 xg durante 15 min. consiguiendo una nítida separación entre la fase clorofórmica conteniendo los lípidos y la fase metanol-agua conteniendo el material no extraíble.

La fase lipidica, diluída con benceno, se llevó a sequedad evaporando a vacío en un rotavapor Buchi cuidando que la temperatura no excediera de 30° C., y en atmósfera de nitrógeno los lípidos se guardaron a -20° C. hasta su utilización.

La fase metanol-agua, conteniendo el material no extraído con cloroformo-metanol, se llevó a sequedad en idénticas condiciones que las utilizadas para los lípidos, y el residuo proteico seco, se solubilizó en tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, 1% de SDS, filtrandose con ultrafiltros Millipore de 3 μ .

El segundo método consistió en la utilización de cromatografía de filtración por gel (7) (8) (9). Hemos empleado una columna Whatman de 100 x 1,5 cm. con adaptadores de flujo.

Estudios comparativos del material delipidado desde el punto de vista de movilidad electroforética relativa, espectroscopía de absorción y análisis de proteína y fósforo no mostraban diferencia entre el material obtenido por uno u otro método, por tanto, como método preparativo empleamos el primero dada su rapidez y capa

cidad practicamente ilimitada

2.1.4. Preparación de BR en agua

La BR delipidada y solubilizada en 1% de SDS se dializó frente a agua destilada, con cambios diarios del medio de diálisis. Durante una semana realizamos - el proceso a temperatura ambiente, continuando después a 4° C. hasta un mínimo de 21 días.

2.1.5. Solubilización de MP en solventes orgánicos

Con el fin de preparar bicapas planas o monocapas con BR, necesitábamos disponer de BR en solventes orgánicos apolares. Para ello, se resuspendieron - mediante agitación pellets de MP obtenidos por centrifugación a alta velocidad en una solución de 20 mg/ml. de LYH del solvente orgánico deseado (decano o hexano), en una relación de 2-4 mg. de proteína de MP por ml. de la solución de LYH. Esta mezcla fue sonicada en baño de hielo durante 10 min. a intervalos de 2 min.

La suspensión resultante se centrifuga a baja velocidad o se deja durante 24 h. y se decanta. El sobrenadante es estable durante varias semanas y guarda el color ligeramente más rojo que las suspensiones de MP en agua.

A algunas de las muestras se añadió Cl_2Ca a MP antes de resuspenderse en el solvente orgánico, de

modo que la concentración final de Cl_2Ca en el solvente fuese 12,5 μM .

2.1.6. Preparación de lecitinas de yema de huevo

Fosfatidilcolina (LYH) pura, se ha obtenido a partir de yemas de huevo tras extracción con solventes orgánicos y purificación en columna de alúmina. Hemos utilizado dos métodos, uno de ellos permite analizar casi la totalidad de los lípidos constituyentes, mientras que el otro permite obtener exclusivamente fosfatidilcolina en grandes cantidades.

En el primer caso partimos de dos huevos y esquemáticamente operamos según (10). Utilizamos una columna de 2 x 40 cm. y en los eluyentes omitimos el uso de BHT como antioxidante, recogiendo las distintas fracciones del eluido en atmósfera de nitrógeno.

En el segundo método partimos de 12 huevos y con ligeras modificaciones seguimos el método de Singleton y otros (11). Nosotros utilizamos éter etílico en vez de éter de petróleo. Hemos empleado una columna de 100 x 5 cm., y la salida del eluato fue siempre en atmósfera de nitrógeno.

En ambos casos, hemos utilizado alúmina neutra (Al_2O_3) (actividad I) para cromatografía en columna Merck. Previo a su utilización, se volvió a activar a 110° C. durante 24 h., y se dejó enfriar en un desecador a vacío.

Las fracciones de columna se analizaron qualitativamente por cromatografía en capa fina. Como adsorbente, hemos empleado gel de sílice H (Merck) formando la pasta con agua. El espesor fue de 0,5 mm. Antes de su utilización, las placas se activaron a 110° C. durante 1 h.

Como eluyentes, hemos empleado dos sistemas: cloroformo-metanol-acético-agua (25/15/4/2) y cloroformo-metanol-amoniaco 7M (46/16/3) en cámara saturada.

Reveladores empleados:

- Ninhidrina al 0,25% (P/V) en acetona. De esta forma, se localizan los fosfolípidos con N-terminales: fosfatidil etanolamina y lisofosfatidiletanolamina.
- Vapores de I₂: se fija a los dobles enlaces, determinando de este modo aquellos lípidos, cuya cadena sea insaturada.
- Reactivo de Dragendorff. Nos permite caracterizar aquellas fracciones que contengan alcaloides o colina.

Aquellas fracciones homogéneas desde el punto de vista cromatográfico se juntaron y llevaron a sequedad a vacío y 30° C. disolviéndose en cloroformo-metanol (2;1) a una concentración aproximada de 20 mg/ml. En atmósfera de nitrógeno, las lecitinas se envasaron en ampolas de 5 y 10 ml. y se guardaron a -20° C.

Los rendimientos obtenidos oscilaron entre 0,4 y 0,6 gr. de fosfatidilcolina por yema tratada.

2.1.7. Preparación de liposomas

Fundamentalmente, seguimos el método de Huang y otros (12) (13). La solución stock de lecitina en Cl-Me (2:1) se lleva a sequedad en atmósfera de nitrógeno. Se redissuelve en éter (al menos dos veces) con objeto - de eliminar totalmente el cloroformo (14) y se evapora hasta peso seco constante.

Los lípidos se suspenden en el tampón de trabajo correspondiente, mediante un Super Mixer (Lab. Line Instruments Inc.) hasta su total dispersión.

En baño de hielo, bajo corriente de nitrógeno y a intervalos de 10 min., la dispersión lipídica se somete a ultrasonificación en un Ultrasonic Power Unit MSE (20 KHz) operando a máxima potencia.

Centrifugando a 150.000 xg, 4° C. y durante 1 h., se separa el material no dispersado, así como el titanio desprendido de la sonda. El sobrenadante, lo aplicamos a una columna de Sepharosa 4 B (Pharmacia) - de 2,5 x 45 cm. con adaptadores de flujo. Previamente, la columna se lavó con penta-clorofenol 10^{-5} M, para - evitar cualquier agente bacterial contaminante, y durante 24 h. se ha equilibrado con el tampón utilizado en la preparación de liposomas, que así mismo se emplea -

como eluyente. Durante todo el proceso, la columna se mantiene a 4° C. Las fracciones colectadas son de 4 ml.

El perfil de elución de la columna, se determinó midiendo la absorbancia a 300 nm. de cada una de las fracciones (12). En todos los casos aparece una fracción I que coincide con el volumen de exclusión, saliendo a continuación la fracción II que representa la población de liposomas de pared única, de la que tomamos las fracciones consideradas como más homogéneas en tamaño. En estas fracciones, se ha establecido la proporcionalidad entre absorbancia a 300 nm. y contenido en fósforo, lo que nos permite determinar concentraciones espectroscópicamente.

2.1.7.1. Liposomas de LYH

Se han utilizado dos concentraciones distintas de fosfolípidos: 200 ± 25 mg. y 2000 ± 50 mg., suspendidos siempre en 10 ml. de tampón. El tiempo de sonicación, ha oscilado entre 60 y 90 min.

2.1.7.2. Liposomas de LYH + BR

Se ha utilizado una sola concentración de lípidos, 200 ± 10 mg., suspendidos en 10 ml. de tampón y sonicados durante 60 min. A continuación se agregó la MP correspondiente suspendida en 2 ml. de tampón continuando la sonicación durante 20 min. A las distintas fracciones se le determinó el contenido en fósforo y proteína,

estableciendo así la relación proteína lípido en los liposomas.

2.2. METODOS QUIMICOS

2.2.1. Determinación de proteína

Seguimos el método de Lowry (15). Cuando las muestras tenían SDS la absorbancia tanto a 500 como a 750 nm. disminuye, y para corregir este descenso, añadimos el detergente adecuadamente al blanco y standards. En presencia de TRITON-X100 evitamos la turbidez con SDS al 0,1% (P/V) (3).

Como patrón utilizamos seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, cristalizada y liofilizada) a una concentración de 2 mg./ml. Teniendo en cuenta que $\epsilon_{278} = 6,58$ dl/gr.cm. (16), en todas las determinaciones se corrigió el contenido de BSA obtenido gravimetricamente por el contenido obtenido espectrofotométricamente, evitando errores debidos sobre todo a hidratación de BSA.

2.2.2. Determinación de fósforo

Esencialmente seguimos el micrométodo de Bartlett (17) con ligeras modificaciones, determinando la absorbancia del ácido fosfomolibdico a 830 nm., tras la digestión de las muestras con ácido perclórico del 60%.

Como patrón empleamos $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (Merck para análisis) desecándolo a 110° C., durante 24 h. Lo dejamos enfriar a vacío, y los standard los preparamos por pesada

directa en una balanza de precisión (10^{-5} gr.).

2.2.3. Determinación de retinal

El retinal se extrae en presencia de bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA) e hidroxilamina, por el procedimiento de Bligh-Dyer (6) (18). Después de centrifugar, se separa la fase clorofórmica, se diluye con benceno, y se evapora hasta sequedad bajo vacío. El residuo se disuelve en un volumen adecuado de etanol, y la cantidad de retinal-oxima se determina espectrofotométricamente a 335 nm., utilizando el siguiente coeficiente de extinción $\epsilon_1^{1\%} \text{ cm.} = 2020$ (19).

2.2.4. Solubilización de membrana púrpura

(MP) en tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, con detergentes

2.2.4.1. Isotermas de solubilización. Material no sedimentable por centrifugación diferencial

2.2.4.1.a. Concentración proteica constante

En este caso utilizamos: un detergente aniónico, dodecil sulfato sódico (SDS); un detergente no iónico, TRITON X100; y una sal biliar, desoxicolato sódico (DehNa).

A alicuotas conteniendo 1 mg. de proteína de MP en 1 ml. se agregaron cantidades crecientes de detergente, se incubaron a 25° C., durante un tiempo adecuado

según el caso, y se centrifugaron a 160.000 xg, 90 min. y 25° C.

La fracción de material solubilizado se calculó determinando el contenido proteico en pellets y sobrenadantes. La desnaturalización del complejo púrpura se comprobó siguiendo la absorbancia a 568 nm.

2.2.4.1.b. Concentración de detergente constante.

En este caso sólo empleamos SDS. Fracciones de MP comprendidas entre 0,2 y 3 mg. de proteína, se centrifugaron a 150.000 xg, 60 min. y 4° C. A los pellets suspendidos en 0,8 ml. de tampón se le agregaron 200 µl. de una disolución de SDS al 0,5% (P/V) (5 mg/ml.).

Las condiciones de solubilización, fueron idénticas a las reseñadas anteriormente.

2.2.4.2. Isotermas de solubilización. Calorimetría

También se estudió calorimétricamente la interacción de cantidades crecientes de SDS con cantidades fijas de MP (0,75 mg/ml. de proteína según Lowry), lípidos de MP (0,75 mg./ml. de peso seco) y BR en agua (0,75 mg./ml. de peso seco).

MP y BR, se utilizaron suspendidas en el medio tamponado, mientras que los lípidos se prepararon en forma de vesículas como sigue. Lípidos de MP disueltos en

cloroformo, y conservados a -20° C. en atmósfera de nitrógeno, se llevaron a sequedad en atmósfera de nitrógeno hasta peso seco constante. Se formaron suspensiones a la concentración referida, y finalmente en baño de hielo y atmósfera de nitrógeno a intervalos de 10 - min., se sonicaron con un tiempo total de 40 min.

Se prepararon disoluciones de SDS a distintas concentraciones, y en cada experiencia se mezclaron 2 ml. de solución problema con 3 ml. de solución de SDS.

En cada caso, el calor de dilución del SDS fue anulado automáticamente en la célula de referencia. El final de la reacción se comprobó mezclando nuevamente el sistema de reacción y observando que no aparecían calores adicionales.

2.2.4.3. Segregación lípido-proteína de MP por detergente en gradientes de densidad

Fraciones de membranas conteniendo 2 mg. de proteína de MP se suspendieron en 1 ml. de tampón con la cantidad adecuada de SDS, y se dializaron durante 5 días frente al tampón correspondiente.

Se formaron gradientes lineales de sacarosa 10-40% (P/V) con un volumen de 12 ml., sobre ellos se depositaron las muestras ya dializadas y se centrifu-

garon durante 30 h. en un rotor angular a 160.000 xg y 25° C.

Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,56 ml., que fueron analizadas alternativamente para determinar contenido en proteína y fósforo.

Un gradiente en blanco se sometió a tratamiento idéntico, determinándose en cada fracción el índice de refracción, con objeto de conocer el perfil de densidad a lo largo de estos gradientes.

2.2.5. Digestión de MP y BR con enzimas proteolíticos

2.2.5.1. Proteólisis de MP

Se estudió la acción que sobre la MP ejercen los siguientes enzimas: Papaina (Sigma), termolisina (Sigma), quimotripsina (Pevya), reptilasa (Sigma), plasmina (Kabi), tripsina (Pevya) y trombina - (Parke-Davis).

Las cuatro primeras, se prepararon suspendiendo un mg/ml. en ClNa 0,15 M, mientras que el medio utilizado para las últimas fue ClH 1 mM.

A muestras de MP con una concentración de 1 mg./ml. en tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH 7,7 se añadió Cl_2Ca 5 mM como activador para todos los enzimas excepto papaina para la que se utilizó cisteína 5 mM y EDTA 2 mM. La temperatura de incubación fue de 37° C.

preincubando previamente las muestras durante 10 min. antes de añadir el enzima. La relación entre enzima/proteína fue 1/20 (p/p) y el tiempo de hidrólisis variable según los casos. El final de la reacción enzimática se consiguió colocando las muestras en tubos previamente enfriados en hielo, y como inhibidores, iodoacetamida 2 mM para la papaina y EDTA 2 mM para las restantes.

Las muestras se centrifugaron a 100.000 xg, 30 min. y 4° C. Los pellets se lavaron con tampón, volviendo a centrifugar en idénticas condiciones.

El control cinético se realizó, disolviendo - los pellets residuales en tampón fosfato 0,01 M, pH = 7,2, 1% de SDS, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se hicieron los siguientes controles electroforéticos: MP sin incubar; MP incubada sin enzima; MP tratada con enzimas previamente inhibidos; y enzima a concentraciones idénticas que tendría si no se hubiese eliminado en el sobrenadante de ambas centrifugaciones.

De forma análoga a la anteriormente expuesta, MP se digirió con quimotripsina y reptilasa a una relación 1/10 (P/P) enzima/proteína, y con termolisina a 45° C. en idéntica relación 1/10 (P/P). En ambos casos los tiempos de hidrólisis fueron mayores, 60 y 120 min.

Las gráficas que muestran el curso cinético - de proteólisis se hicieron a partir de las áreas obtenidas.

das densitometrando los geles correspondientes de los residuos insolubles de cada momento de hidrólisis. La masa molecular relativa de los productos insolubles de hidrólisis, también se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Al pellet residual de digestión de MP, se hicieron estudios espectroscópicos de absorción y emisión, y de dicroísmo circular (DC). Los productos insolubles se caracterizaron hidrodinámicamente por estudios de ultracentrifugación analítica, y los péptidos solubles hidrolizados se analizaron por combinación bidimensional de cromatografía y electroforesis de alto voltaje en papel.

2.2.5.2. Proteolisis de BR en agua

BR en agua, a una concentración de 1 mg/ml. se dializó durante 3 días frente a tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, cisteína 5 mM y EDTA 2 mM. De forma análoga - que con MP, se procedió a una digestión con papaina a una relación enzima/proteína 1/20 (P/P), durante 30 min. Tras comprobar electroforéticamente una hidrólisis total, se procedió a estudiar los péptidos solubles producto de dicha hidrólisis.

2.2.5.3. Proteolisis de células completas de H.H.

Alcanzado en un cultivo la fase estacionaria,

las células se recogieron en la forma reseñada en 2.2.1.2. y se suspendieron en ClNa 4 M a una A_{568} de 0,690.

Fracciones de dicha suspensión de 35 ml., tras agregar los activadores correspondientes a cada enzima, se preincubaron durante 10 min. A una de ellas se agregó 0,8 mg. de papaina y se incubó a 37° C. durante 1 h. Otra se incubó durante 2 h. a 45° C. tras agregar 1,25 mg. de termolisina y una tercera, tras agregar 1,25 mg. de quimotripsina se incubó a 37° C., tomándose una alícuota a las 8 h. y terminando la incubación del resto a las 24 h.

Una vez terminada la hidrólisis, se procedió a un fraccionamiento subcelular de cada una de las muestras según 2.1.2. para obtener MP, que se sometió a control electroforético.

2.2.5.4. Proteolisis con papaina de MP fotolizada

Una suspensión de MP en 4 ml. de tampón - TRIS- ClH 0,1 M, cisteína 5 mM, EDTA 2 mM, $\text{NH}_2\text{-OH}$ 0,2 M, pH = 7 ($A_{568} = 1$) se fotolizó durante 2 h. con luz procedente de una lámpara Hg-Xe de 1000 W, filtrada a través de 15 cm. de agua, 10 cm. de una solución al 1% de SO_4Cu y un filtro Wratten con una λ_{corte} de 430 nm (20).

Antes y después de la fotólisis, se registró el espectro de absorción de esta suspensión, a la cual una vez fotolizada y preincubada durante 10 min. a 37° C. se le agregaron 100 μ l. de una suspensión de papaina (1 mg/ml.) en ClNa 0,15 M y se continuó la incubación durante 30 min.

Tras centrifugar en las condiciones mencionadas anteriormente (2.2.5.1.), el pellet se disolvió en 1 ml. de tampón fosfato 0,01 M, pH = 7,2, 1% de SDS para su estudio electroforético.

Una preparación análoga a la anterior, salvo que no contenía hidroxilamina se dividió en dos partes que se utilizaron como controles: A uno, se le agregaron 40 μ l. de la suspensión de papaina, y se procedió a su fotólisis, mientras que al otro se le fotolizó sin tratamiento especial.

Los procesos de fotólisis, control espectral, incubación y electroforesis fueron análogos en los tres casos.

2.3. METODOS FISICOS

2.3.1. Electroforesis de zona en geles de poli- acrilamida en SDS: Homogeneidad, pu- reza y peso molecular

La electroforesis ha sido realizada de acuerdo con el método de Weber y Osborn (21). Empleamos ge-

les del 7,5%, 0,6 cm. de diámetro y 7 cm. de longitud. Trabajamos a temperatura ambiente (20-25° C.), con una intensidad de corriente constante de 8 mA por gel, y un tiempo comprendido entre 4 y 5 h. En todos los casos se hizo una preelectroforesis de 30 min. previa a la colocación de la muestra.

El teñido se realizó con negro amido o con azul brillante de Coomassie, empleando 3 h. para el primero y 1/2 ó 1 h. para el segundo, dependiente de la cantidad de muestra presente en los geles. El exceso de colorante, se eliminó lavando los geles con acético al 7,5% y metanol al 5% durante varios días.

Finalmente, los geles se guardaron en tubos de ensayo con 7,5% de ácido acético.

En alguna ocasión el tampón de las cubetas electroforéticas (tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,2, 0,1% SDS) fue aumentado en su contenido en SDS hasta 1%, no observándose variación en los resultados, salvo una mayor inercia en la acción de los colorantes.

Una vez teñidos los geles y eliminado el exceso de colorante, se densitometraron en un microdensímetro Joyce Loeb1, modelo MK III C de doble rayo. La distancia de los máximos de cada pico al origen, representa la movilidad relativa respecto a proteínas standard en las mismas condiciones. El área es aproximadamente proporcional a la cantidad de proteína contenida

en la banda electroforética.

Cuando las proteínas son tratadas con SDS se obtiene, para una concentración constante de gel, una relación aproximadamente lineal entre la movilidad electroforética relativa y el logaritmo de la masa molecular (22). El SDS se considera que se liga igualmente a todas las proteínas eliminando las diferencias en conformación, densidad de carga, volumen específico parcial y grado de hidratación existentes entre ellas. Esto hace posible la determinación de masas moleculares, lo cual hemos hecho con MP y con la proteína previamente delipidada, y productos insolubles de digestión con proteasas.

Como proteínas standard hemos utilizado: Citocromo C (Fluka) 13.000; seroalbúmina bovina BSA (Sigma) 68.000; Ovoalbúmina (Sigma) 43.000; Tripsina (Pevya) 23.300. Previamente a su utilización se trataron con 1% de 2-mercaptoetanol en tampón fosfato 0,001 M pH = 7,2, 1% de SDS, en un baño de agua hirviendo durante 5 min. (21).

2.3.2. Mapas peptídicos. Combinación bidimensional de cromatografía descendente - con electroforesis de alto voltaje en papel

Los sobrenadantes conteniendo los péptidos solubles producto de hidrólisis de MP y BR en agua con pro

teasas (2.2.5.1. y 2.2.5.2.) fueron tratados con tricloroacético 10 mM, para precipitar el enzima y cualquier fracción proteica no hidrolizada. Después se centrifugan durante 15 min. a 20.000 xg y se separan los sobrenadantes, de los que mediante una extracción líquido-líquido se elimina el tricloroacético operando durante 5-7 h. La total extracción se comprueba mediante medida del pH de la muestra.

Cada una de estas muestras, la dividimos en cuatro fracciones que guardamos en congelador hasta su utilización.

Usamos papel Whatman 3 MM (46 x 57 cm.), previamente lavado tres veces con acetato amónico 1 M, - aclarado repetidas veces con agua destilada y secado a 80° C.

En todo el proceso siguiente, esquemáticamente operamos según (24). La cromatografía descendente se hizo en el sentido de la mayor dimensión del papel, empleando rojo fenol como marcador de frente que no interfiere en la electroforesis ulterior, ya que al pH - que trabajamos emigra hacia el ánodo, mientras que los péptidos lo hacen hacia el cátodo. Como solvente empleamos n-butanol: piridina: acético: agua (90:60:18:72) en cámara saturada. Trabajamos a temperatura ambiente (20-25° C.) y el tiempo de desarrollo de los - cromatogramas fue de 20 h. Una vez terminada la croma

tografía, el papel se colocó en un soporte de vidrio, secando a 80° C. durante 20 min.

La electroforesis de alto voltaje se hizo en la segunda dimensión del papel, ajustando éste a las dimensiones de la cubeta (46 x 48 cm.). Empleamos un aparato de electroforesis de alto voltaje construído en los talleres del Instituto "Rocasolano". El tampón de electroforesis fue un sistema piridina-acético pH = 3,6 (100 ml. de acético, 10 ml. de piridina y agua hasta 3.000 ml.). Como líquido refrigerante empleamos disolvente desodorizado D₂ (Campsa), isoparafina de - punto de ebullición 170-210° C. y punto de flash de - 37° C. La temperatura osciló entre 18-26° C. La fuente de alto voltaje es de 8 KV. y 1 A máximo. El tiempo de duración de cada experimento osciló entre 40 y 60 min., y siempre trabajamos a 2 KV. y una intensidad de 190-220 mA.

Como mezcla de tinción para el revelado empleamos: ninhidrina: collidina: acético: etanol (1 gr.: 80 ml.: 200 ml.: 600 ml.) pulverizando todo el papel y secando en estufa a 80° C. durante 5-10 min.

2.3.3. Determinación de pesos secos por gravimetría a presión y temperatura controladas

La exactitud y precisión en la determinación de volúmenes específicos, coeficientes de extinción, - composición etc, depende en gran parte de la exactitud y precisión del metodo de medida de concentraciones, - para lo cual es necesario conocer el valor del peso se co en condiciones constantes y exactamente reproducibles. Tras varias tentativas de secar a vacío, incluso empleando termobalanzas, siempre existía la posibilidad de que se produjese alguna pérdida de material, por ello pensamos que el método más adecuado, sería el basado en la utilización de un saco de diálisis como recipiente para la muestra (25). Después de lavar exhaustivamente los sacos de diálisis, introdujimos la muestra a pesar cuidando bien que no quedase nada por las paredes, se cerraron se colocaron en vasos de precipitado y se procedió a su liofilización.

El secado final, hasta alcanzar un valor de peso seco constante, fue realizado en una electrobalanza Cahn RG, especialmente diseñada para registrar cambios de peso de una muestra operando en alto vacío, at mósferas controladas o aire, y en márgenes amplios de temperatura. Las condiciones de nuestras determinaciones, fueron una presión de 10^{-6} Torr. y temperaturas - comprendidas entre 40 y 68° C., no observándose variaciones de peso al pasar de una a otra. La sensibilidad de la balanza es de 10^{-6} gr. para una cantidad de muesg

tra inferior a 1 gr. límite superior, que nunca alcanzamos nosotros.

Las operaciones de pesada nos las realizó gentilmente el Dr. J. L. García Fierro, el cual describe detalladamente el dispositivo (26), y a quien expresamos nuestro sincero agradecimiento.

Una vez alcanzado un peso constante, extrajimos la muestra solubilizándola, volviendo a pesar el -saco de diálisis en idénticas condiciones. Por diferencia de pesada conocíamos el material seco extraído que estaba contenido en un determinado volumen de disolución de muestra, fácilmente calculable determinando la densidad de la disolución y conociendo el peso de ésta.

Hicimos los adecuados controles de pesos en blanco de los sacos de diálisis, y hasta una temperatura de 70° C., fueron repetitivos con la sensibilidad - de 10^{-6} gr. e incluso, regenerables en los procesos - de diálisis, de acuerdo con (25). Una vez conocidos los valores exactos de la concentración de cada una de las soluciones - MP en agua, BR en 1% de SDS y BR en agua - a las que previamente se había determinado su contenido proteico mediante el método de Lowry, se calculó el factor de conversión de éste contenido proteico en peso seco.

2.3.4. Determinación de volúmenes específicos parciales. Medidas de densidad

El valor del volumen específico parcial aparente, ϕ , medido a una única concentración de soluto, c (gr/ml.) viene relacionado con tres parámetros característicos del sistema por la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\rho - \rho_0}{c} \right) \quad (1)$$

donde ρ y ρ_0 son las densidades de la solución y del solvente respectivamente en gr/ml. Esta relación sugiere, que el volumen específico parcial pueda ser determinado por medio de una medida de densidad diferencial de alta precisión ($\rho - \rho_0$). La cantidad crítica empleada en medidas de pesos moleculares por ultracentrifugación es $(1 - \phi\rho_0)$, por tanto un error del 1% en la determinación del peso molecular, requiere que ϕ sea conocido con un error $\pm 0,001$ (ml/gr), lo cual implica una medida de concentración de gran exactitud y una densidad diferencial determinada al menos con una exactitud de 10^{-5} gr/ml. Esto exige un grado de termostatación del sistema de $\pm 0,01^\circ$ C.

Hemos utilizado un densímetro DMA 02 D (A. Paar, Graz. Austria) termostatizado a $25 \pm 0,01^\circ$ C. y el fundamento de las determinaciones de densidades diferenciales, está descrito por sus diseñadores en varias publicaciones (27).

La densidad diferencial entre dos muestras,

puede determinarse basándonos en la expresión:

$$\rho_1 - \rho_2 = K(T_1^2 - T_2^2) \quad (2)$$

donde K, se obtiene a partir de la diferencia de periodos medidos para agua y aire a 25° C. y de su diferencia de densidades a esta temperatura obtenida a partir de tablas. Una vez conocida K, cualquier densidad diferencial puede calcularse a partir de los correspondientes valores de T (periodo)

La exactitud del densímetro fue comprobada - por medidas en soluciones de cloruro sódico de concentración perfectamente conocida, cuyas densidades se encuentran en las tablas de Landolt-Börnstein (28). De este modo comprobamos que se pueden medir diferencias de densidad con seis cifras decimales exactas.

2.3.5. Determinación de c.m.c. de SDS en tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, mediante conductimetría

Realizamos medidas de resistencia en una serie de soluciones simultáneamente preparadas y cubriendo el rango de 0,01 - 0,4% (P/V) de SDS, en un baño - termostatzado a $25 \pm 0,05^\circ$ C. Para ello empleamos un puente de medida de impedancias en una célula de conductividad de constante $0,1 \text{ cm}^{-1}$. Utilizamos tubos de ensayo pyrex, y el procedimiento consistió en transfe

rir la célula en orden creciente de concentraciones, cuidando bien, de eliminar las burbujas adheridas.

Las medidas de resistencia determinadas, tienen un error de $\pm 0,1\Omega$ y representando los valores obtenidos frente a la concentración de SDS, obtenemos dos rectas que se cortan en el punto correspondiente al valor de la c.m.o. (figura 4).

2.3.6. Medidas de entalpías de unión. Microcalorimetría

Los experimentos calorimétricos, han sido realizados en un microcalorímetro LKB, tipo batch, descrito por Wadsø (29).

El calorímetro se calibró eléctricamente comprobando su funcionamiento con una reacción de neutralización TRIS-ClH, cuyos resultados concuerdan con la bibliografía (30). El calor de dilución se determinó diluyendo las muestras frente al tampón correspondiente.

2.3.7. Medida de viscosidades

Hemos utilizado un viscosímetro tipo Ubbelohde con un tiempo de caída de agua de 195,6 seg. El baño termostaticado se estabilizó a $25 \pm 0,05^\circ \text{C}$. Las determinaciones se realizaron a varias concentraciones y se extrapolaron los valores de η_{sp}/c y $\ln \eta_r/c$ a concentración cero, para obtener la viscosidad intrínseca como ordena-

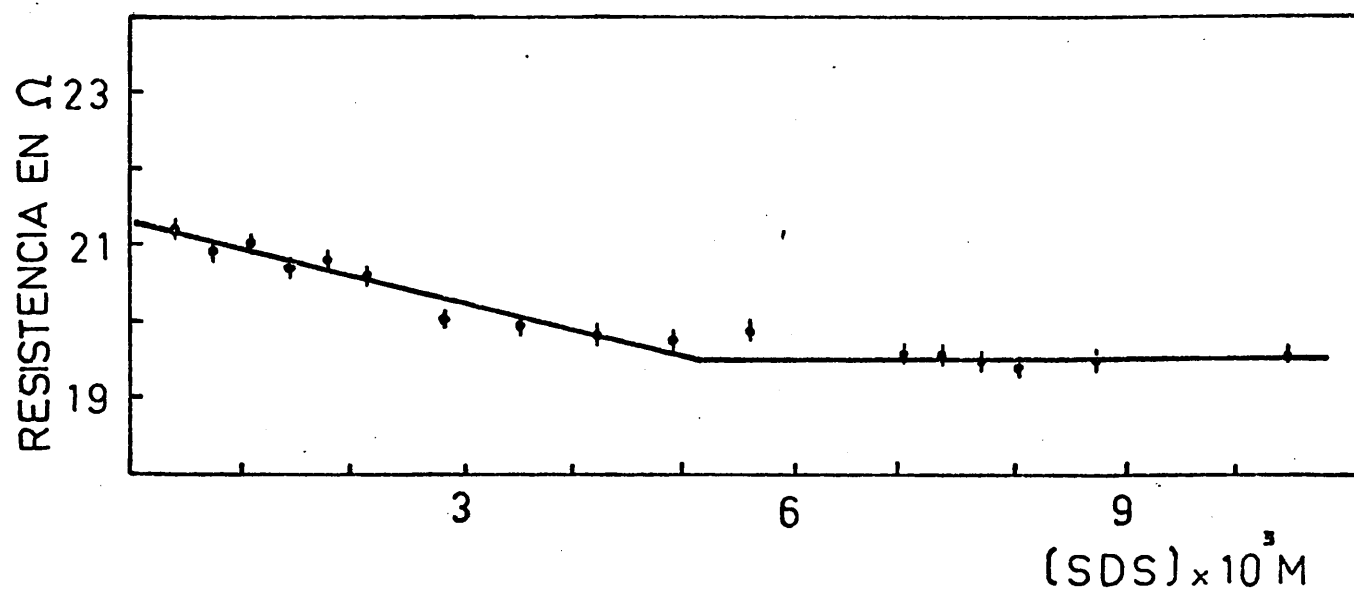


Figura 4.- Determinación de c.m.c. de SDS, en tampón TRIS-ClH
0,1 M, pH = 7,7.

da en el origen.

2.3.8. Ultracentrifugación analítica

2.3.8.1. Velocidad de sedimentación

Se ha utilizado una ultracentrífuga analítica Beckman modelo E, con scanner fotoeléctrico. Los experimentos se han llevado a cabo a 60.000 r.p.m., $25 \pm 0,1^\circ \text{C.}$, en células de doble sector de Al de 12 mm. de paso de luz. El sistema óptico utilizado, ha dependido de la naturaleza de la sustancia sedimentada. Se utilizó sistema Schlieren para disoluciones sin SDS y Scanner a 280 nm. para disoluciones con SDS o baja concentración de proteína.

Los coeficientes de sedimentación, se determinaron a distintas concentraciones y se extrapolaron a concentración cero,

2.3.8.2. Equilibrio de sedimentación

Las muestras estudiadas mediante equilibrio de sedimentación, fueron previamente equilibradas con su tampón correspondiente por diálisis exhaustiva (mínimo de 21 días en casos de muestras con SDS) a la misma temperatura a la que se iba a hacer el experimento.

Las células de doble sector se llenaron haciendo coincidir los meniscos de la disolución y del disolvente, y sin utilizar aceite para formar un fondo artificial, dada la posible interacción entre el deter

gente y el aceite. La línea base de cada célula, se determinó llevando el rotor a alta velocidad hasta conseguir la sedimentación de la proteína. Utilizamos sistema óptico de absorción a 280 nm. con detección fotoelétrica.

Los experimentos se realizaron a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$. En todos los casos se utilizó durante las primeras horas una sobrevelocidad, para después bajar a una velocidad menor de la de régimen durante un corto tiempo. Una vez alcanzada la velocidad de régimen, se registró la distribución de proteína a lo largo de la célula cada 12 h., concluyéndose el experimento cuando esta distribución alcanza el equilibrio, esto es, cuando los registros efectuados en un intervalo de 24 h. son perfectamente superponibles.

2.3.8.3. Equilibrio de sedimentación en sistemas de varios componentes

FUNDAMENTOS TEORICOS

Uno de los métodos más empleados y exactos en la determinación de masas moleculares de proteínas, es el de equilibrio de sedimentación por ultracentrifugación analítica, con un fundamento íntegramente termodinámico (31) (32) (33) (34).

Hemos trabajado con un sistema multicomponente: tampón (componente 1), proteína (componente 2) y -

detergente (componente 3), en el cual el componente molecular macroscópico a estudiar es el complejo proteína-SDS. El SDS es necesario para mantener la proteína en solución verdadera, condición que es necesaria para utilizar este método.

La ecuación de distribución de equilibrio de un único componente macromolecular ideal, es un sistema de tres componentes viene dada por:

$$\frac{d \ln C_2}{dr^2} = \frac{M_{2app} \omega^2 (1 - \bar{v}_2 \rho_0)}{2RT} + \frac{M_3 \omega^2 (1 - \bar{v}_3 \rho_0)}{2RT} \left(\frac{\delta m_3}{\delta m_2} \right) \mu_3 \quad (3)$$

En esta ecuación, C_2 es la concentración de la proteína en la posición radial r en la célula, y M_{2app} es el peso molecular anhidro aparente de la proteína, - el cual refleja el comportamiento no ideal termodinámico de la solución proteica y está relacionado con el peso molecular verdadero M_2 por:

$$M_{2app} = \frac{M_2}{1 + C_2 \left(\frac{\delta \ln \gamma_2}{dC_2} \right)} \quad (4)$$

donde γ_2 , es el coeficiente de actividad para la proteína. Si expresamos los coeficientes de actividad por un desarrollo en serie de potencias:

$$\frac{1}{M_{2app}} = \frac{1}{M_2} + \frac{B\bar{C}}{2} + \dots \quad (5)$$

llegamos a una expresión en función del "segundo coeficiente del virial", donde \bar{C} es la concentración a que se determina M_{2ap} . Este efecto debe tenerse en cuenta, en sistemas no ideales como por ejemplo una proteína - con SDS.

Extrapolando a concentración cero los valores de M_{2ap} obtenidos a varias concentraciones, llegaremos al valor real de la masa molecular de la macromolécula en estudio.

Los otros símbolos de la ecuación (3), son los siguientes: ω^2 , velocidad angular del rotor de la centrífuga, \bar{v}_2 volumen específico parcial de la proteína, ρ_0 densidad del disolvente, R es la constante de los gases, M_3 y \bar{v}_3 , son los parámetros moleculares correspondientes para el componente 3, y $(\delta m_3 / \delta m_2) \mu_3$, llamado "término preferencial de interacción" es una expresión de la interacción entre el soluto macromolecular y los componentes del sistema solvente (m = concentración molal).

Cuando se trata de interacciones de proteínas con tampones diluidos, el último término de la ecuación (3), puede despreciarse, pero en nuestro caso concreto, es precisamente la interacción del SDS con la proteína, la que nos permite la caracterización molecu

lar de ésta, por tanto este término es de suma importancia y debe tenerse en cuenta al estudiar dicha interacción.

Por un riguroso análisis termodinámico, Cassasa y Eisenberg (35), han demostrado que el peso molecular anhidro de una macromolécula en un sistema multicomponente interaccionante, puede obtenerse sin un conocimiento exacto de las interacciones entre los componentes del sistema. Conceptualmente consiste en definir nuevos volúmenes específicos después que el sistema interaccionante, es -dializado hasta equilibrio.

En un sistema ideal de dos componentes, \bar{v}_2 es el volumen específico parcial termodinámicamente definido del soluto, es decir para una proteína ideal, es el -incremento en el volumen que resulta al agregar un gramo de proteína en una forma completamente definida (anhidra e isoiónica) a un gran exceso de solvente. Normalmente, todas las medidas de proteínas en solución, se realizan al menos en sistemas solventes de dos componentes, por ejemplo tampón diluído; esto supone que la cantidad medida -es el incremento de densidad que resulta al agregar un gramo de proteína en una forma definida, al disolvente -mezcla (agua más el otro u otros componentes). El incremento de volumen por gramo de proteína agregado, es lo -que se define como "volumen específico aparente", ϕ_2 , de la proteína. La ecuación de trabajo, para la determinación de ϕ_2 es:

$$\phi_2 = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\Delta\rho}{C_2} \right) \quad (6)$$

donde ρ_0 , es la densidad del disolvente, $\Delta\rho$ la diferencia de densidad entre la solución proteica y el disolvente, y C_2 es la concentración de proteína (gr/ml.) - en la disolución. El valor límite de ϕ_2 cuando $C_2 \rightarrow 0$ es \bar{v}_2 .

Consideremos un sistema en el cual una solución de una macromolécula (proteína) no permeable a través de un saco de diálisis se dializa hasta equilibrio frente a una mezcla de componentes permeables que constituyen el disolvente. Además, uno o más de los componentes permeables interaccionan o se unen a la macromolécula. Si la concentración libre de los componentes permeables, en cada extremo de la membrana de diálisis se consideran iguales, el componente no permeable debe ser redefinido de acuerdo con los componentes del disolvente que interaccionan con él. La concentración de esta especie redefinida puede designarse como C_2^* y su masa molecular M_2^* , donde $C_2^* = C_2 (1 + \sum_i \delta_i)$ y $M_2^* = M_2 (1 + \sum_i \delta_i)$. C_2 y M_2 son la concentración y masa molecular de la macromolécula sin ningún ligando, y δ_i es el peso de componente i , ligado por peso de macromolécula.

Por tanto, un nuevo volumen específico apa-

rente ϕ_2^* , puede determinarse referido a la macromolécula con los componentes ligados del sistema solvente:

$$\phi_2^* = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\Delta^* \rho}{C_2^*} \right) \quad (7)$$

donde $\Delta^* \rho$ es la diferencia de densidad entre la disolución y el disolvente.

Con este volumen específico aparente, la ecuación general de equilibrio (3), se simplifica a la forma de un sistema ideal de dos componentes para el peso molecular M_2^* .

$$\frac{d \ln C_2^*}{dr^2} = \frac{M_2^{*2} \omega^2 (1 - \phi_2^* \rho_0)}{2RT} \quad (8)$$

Finalmente, si $\Delta^* \rho$ se combina con una concentración relativa a la macromolécula anhidra C_2 , se obtiene un nuevo volumen específico aparente definido como:

$$\phi_2' = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\Delta^* \rho}{C_2} \right) \quad (9)$$

Cassasa y Eisenberg (35) han demostrado rigurosamente que esta definición de volumen específico aparente incorpora el término de interacción de la ecuación general de equilibrio, y que conociendo su valor, el peso molecular del componente macromolecular anhidro M_2 , puede obtenerse de la distribución en un equilibrio de sedimentación de la macromolécula con los componentes

del solvente ligados.

$$\frac{d \ln C_2^*}{dr^2} = \frac{M_2 \omega^2 (1 - \phi_2'^{\rho_0})}{2RT} \quad (10)$$

Los tres volúmenes específicos aparentes, se relacionan entre sí según Cassasa y Eisenberg (35)

$$\phi_2' = \phi_2 - \sum_i \left(\frac{1}{\rho} - \bar{v}_i \right) \delta_i \quad (11)$$

$$\phi_2^* = (\phi_2 + \sum_i \bar{v}_i \delta_i) / (1 + \sum_i \delta_i) \quad (12)$$

$$\phi_2' = \phi_2^* - \left(\frac{1}{\rho_0} - \phi_2^* \right) \sum_i \delta_i \quad (13)$$

Por razones obvias, ϕ_2' , es el volumen específico aparente usualmente medido, determinando diferencias de densidades y concentraciones de proteína a peso seco constante.

Más recientemente, Tanford y otros (36), en sus estudios de caracterización molecular de proteínas en soluciones de detergentes (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42), y con las medidas apropiadas de un gran número de detergentes en solución acuosa calculan ϕ_2' , a quien llaman "volumen específico parcial efectivo", a partir de la siguiente relación:

$$(1 - \phi_2'^{\rho_0}) = (1 - \bar{v}_2^{\rho_0}) + \delta_D (1 - \bar{v}_D^{\rho_0}) + \sum_i \delta_i (1 - \bar{v}_i^{\rho_0}) \quad (14)$$

donde δ_D , es la relación de unión (gr/gr.) de detergente a proteína, \bar{v}_D es el volumen específico parcial del detergente unido a la proteína (se cree que este valor, no difiere del que posee en solución), \bar{v}_2 es el verdadero volumen específico parcial de la proteína. El último término, muestra la unión de otras sustancias, tales como lípidos de membrana, extraídos con la proteína.

Esta relación, permite calcular ϕ_2^h , de una forma indirecta, y comprobar en caso afirmativo su correcta determinación.

2.3.9. Medida de difusión

Se ha utilizado un aparato de Electroforesis libre y Difusión (Beckman, modelo H) y una célula standard tipo Tiselius de 11 ml. de capacidad y 5 cm. de camino óptico.

El método de difusión libre usado en una célula tipo Tiselius, está ligado a la formación de una interfase límite de separación muy abrupta entre dos fases adyacentes y la subsiguiente difusión desde esta interfase. Este método permite la evaluación directa del coeficiente de difusión. En el aparato utilizado, la superficie de separación se fabrica por el procedimiento de Kahn y Polson (43) de agudizamiento de la interfase por absorción de líquido a través de una larga aguja hipodérmica conectada a una microjeringuilla.

Las medidas fueron llevadas a cabo a $25 \pm 0,05^\circ$ C. en soluciones de proteínas a varias concentraciones, extrapolando a concentración cero, para encontrar el coeficiente de difusión a dilución infinita.

La valoración del desarrollo de la difusión - se ha seguido por el procedimiento Schlieren de lentes cilíndricas, evaluándose la relación área/altura de las curvas gaussianas obtenidas con un sistema interferométrico Rayleigh, y posterior lectura de la posición de - las líneas de interferencia.

2.3.10. Microscopía electrónica

La morfología y dimensiones de bicapas esféricas de LYH o LYH + MP. preparadas como se indica en 2.1.8, se estudiaron mediante tinción negativa con fosfotungstato sódico, molibdato amónico o acetato de uranilo. La tinción se realizó sobre rejillas cubiertas con Formvar y carbón (44) (45). Una vez secas se examinaron en un - microscopio electrónico Philips 300 o en un Jeol JEN 100 B, del servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C., a cuyo personal encargado se le agradece su ayuda.

2.3.11. Espectroscopía de absorción, emisión y dicroísmo circular en estado estacionario

Los espectros de absorción se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer/Hitachi 200. Los espectros de fluorescencia se registraron mediante un espectro-fluorímetro Perkin Elmer MPF-3 en células de 1 cm. de paso óptico, con una lámpara de excitación de xenon de 150 W. y un fotomultiplicador de respuesta S-11. Aunque se dispone de los factores de corrección necesarios para convertir los espectros experimentales en absolutos (46), para los objetivos de este trabajo no fue necesario llevar a cabo dicha conversión.

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un dicrografo II ROUSSEL-JOUAN 185 (París) del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C., en células de 3 ml. y 1 ml., de 10 mm. de paso óptico.

2.3.12. Fotólisis de destello

Se ha utilizado la técnica de fotólisis de destello para estudiar las especies intermedias, espectroscópicamente detectables, que aparecen transcurridos unos 100 μ s de la excitación fotolítica de BR. El límite de resolución temporal viene determinado en este caso por las características técnicas del sistema experimental disponible diseñado por el Dr. Acuña del Instituto "Rocasolano". Dicho sistema consta de un

dispositivo de producción del destello de excitación y una parte de detección de las especies transitorias. - El destello de excitación se genera descargando un condensador de 2 μ F, cargado a 8-10 KV., a través de una lámpara capilar de cuarzo, conteniendo unos 200-300 torr de Xe ($1 \text{ torr} = 133 \text{ N m}^{-2}$). Las muestras contenidas en células de cuarzo de 1 ó 4 cm. de camino óptico se colocan en un bloque termostatzado que recibe el destello de fotólisis y la radiación analítica formando un ángulo de 90°. Mediante filtros adecuados se suprimen las longitudes de onda menores de 500 nm. del destello de fotólisis.

El análisis de las especies transitorias se lleva a cabo midiendo la atenuación de un haz de luz - continua generado en una lámpara de cuarzo/iodo, 30-150 W. alimentada por c.c. estabilizada por dos unidades - Solartron AS/412 en paralelo. El resto del sistema de análisis incluye un fotomultiplicador EM1 9783B, una - unidad de acondicionamiento de señal y un osciloscopio de memoria HP 181 A. Las trazas de la pantalla del osciloscopio se fotografían para su análisis cinético - posterior en un ordenador HP 9830.

2.4. BIBLIOGRAFIA

- (1) OESTERHELT, D. y STOECKEMUS, W.
Nature New Biology, 233, 149 (1.971)
- (2) OESTERHELD, D. y STOECKENIUS, W.
Methods in Enzimology, 31 (H), 8090
- (3) BECHER, B. M. y CASSIN, J.
Preparative Biochemistry 5 (2) (1.975)
- (4) SUMPER, M., REITMEIER, H. y OESTERHELT, D.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 15 (4) 187 (1.976)
- (5) KANNER, B.I. y RACKER, E.
B.B. Res. Commu . 64 (3) 1054 (1.975)
- (6) BLIGH, H. G. y DYER, W.J.
Can. J. Biochem. Physiol. 34 (8) 911 (1.959)
- (7) HELENIUS, A. y SIMONS, K.
Biochemistry, 10 (13) 2542 (1.971)
- (8) OSBORNE, H.B., SARDET, CH. y HELENIUS, A.
Eur. J. Biochem., 44, 383 (1.974)
- (9) HELENIUS, A. y SIMONS, K.
Biochim. Biophys. Acta 415, 29 (1.975)
- (10) LOPEZ PADRON, J.
Tesis Doctoral (Abril 1.976)
- (11) SINGLETON, W.S. y GRAY, M.S.
J. American Oil Chem. Soc. 42, 53 (1.965)
- (12) HUANG, G.
Biochemistry 8 (1), 344 (1.969)
- (13) HUANG, C. y CHARLTON, J.P.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 46 (4) 1660 (1.972)
- (14) ERDEI, L, JOO, F., CSORBA, I. y FAJSZI
Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung, 2 (1-2)
121 (1.974)
- (15) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., y FARR, A.L.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1.951)
- (16) REISLER, E. y EISENBERG, H.
Biochemistry 8 (11), 4573, (1.969)

- (17) BARTLETT, G.R.
J. Biol. Chem., 234, 466 (1.959)
- (18) KUSHWAHA, S.C., KATES, M. y MARTIN, W.G.
Can. J. Biochem., 53, 284 (1.974)
- (19) WALD, G. y BROWN, P.K.
J. Gen. Physiol. 27, 189 (1.953/54)
- (20) OESTERHELT, D. y SCHUHMANN
Febs. Letters., 44 (3), 262 (1.974)
- (21) WEBER, K. y OSBORN, M.
J. Biol. Chem., 244, 4406 (1.969)
- (22) REYNOLDS, J.A. y TANFORD, CH.
J. Biol. Chem. 245 (19) 5161 (1.970)
- (23) CHRAMBACH, A. y ROBBARD, D.
Science, 172, 440 (1.971)
- (24) Methods in Enzimology, vol. XI, p. 930.
- (25) HARVIE, R.N.
Anal. Bioch. 53, 252 (1.973)
- (26) GARCIA FIERRO, J. L.
Tesis Doctoral Julio (1.976)
- (27) KRATKY, O., LEOPOLD, H. y STABINGER, H.
Methods in Enzimology, 27 D, 98 (1.973)
- (28) LANDOLT - BORNSTEIN
"Physi Kalish. Chemische. Labelen", Ergänzungs.
Band. p. 202 Springer Berlin (1.927)
- (29) WADSO, I.
Acta Chem. Scand, 22, 927-937 (1.968)
- (30) STUTERVANT, J.M. y LYONS, P.A.
J. Chem. Thermodynamics, 1, 201 (1.969)
- (31) TANFORD, CH.
"Physical Chemistry of Macromolécules"
John Wiley & Sons. Inc. Newyork (1.961)
- (32) SCHACHMAN, H.K.
"Ultracentrifugation in Biochemistry".
Academic. Press. New York (1.959)

- (33) VAN HOLDE, K.E.
"Sedimentation Equilibrium, Fraction, nº 1 (1969)
Beckman Instruments Inc.
- (34) WILLIAMS, J.W.
"Ultracentrifugation of Macromolecules". Modern
Topics. Academic Press New York (1.972)
- (35) CASASSA, E.F. y EISENBERG, H.
Advan. Protein. Chem. 19, 287 (1.964)
- (36) TANFORD, CH, NOZAKI, Y., REYNOLDS, J.A. y MAKINO, SH
Biochemistry, 13 (11) 2369 (1.974)
- (37) NOZAKI, Y, REYNOLDS, J.A. y TANFORD, CH.
J. Biol. Chem. 249, (14), 4452 (1.974)
- (38) MAKINO, SH, TANFORD, CH y REYNOLDS, J.A.
J. Biol. Chem., 249 (23) 7379 (1.974)
- (39) GREFRATH, S.P. y REYNOLDS, J.A.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71 (10) 3913 (1.974)
- (40) SCHECHTER, N.M., SHARP, M., REYNOLDS, J.A. y
TANFORD, CH.
Biochemistry, 15 (9) 1897 (1.976)
- (41) RIZZOLO, L.J., MAIRE, M., REYNOLDS, J.A. y TANFORD,
CH.
Biochemistry, 15 (16) 3433 (1.976)
- (42) TANFORD, CH y REYNOLDS, J.A.
Biochim. Biophys. Acta 457, 133 (1.976)
- (43) KAHN, D.S. y POLSON, A.
J. Phys. and Colloid Chem., 51, 816 (1.947)
- (44) JOHNSON, S.M., BANGHAN, A.D., HILL, N.W. y KORN,
E.D.
Biochim. Biophys. Acta, 233, 820 (1.971)
- (45) MUNN, E.A.
Methods in Enzimology, XXXII, 21 (1.974)
- (46) CEBALLOS, A.
Tesis Doctoral, Madrid (1.976)

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE MP Y BR

3.1.1. Masa molecular relativa y criterio de pureza de BR por electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida del 7,5 %, tanto MP como la proteína delipidada, bien con solventes orgánicos o mediante cromatografía en columna, daban una única banda (figura 1).

Representando los RF de proteínas standard frente al logaritmo de sus respectivas masas moleculares relativas, se obtiene una curva de calibración de RF por peso molecular (figura 2), a partir de la cual se determinó una masa molecular relativa para BR de MP, y BR delipidada de 18.700 ± 300 .

3.1.2. Densidad de MP en agua

La densidad obtenida a $25 \pm 0,01^\circ \text{C}$. para MP en agua fué de $1,2464 \pm 0,0001 \text{ gr./ml.}$, resultado de determinaciones en tres preparaciones distintas. En una de estas preparaciones se utilizaron concentraciones medidas gravimétricamente a peso seco constante, y en las otras dos - tras determinar indirectamente el peso seco de MP por el contenido proteico obtenido según el método de Lowry. El factor de transformación de este contenido proteico en peso seco de MP es 1,46.

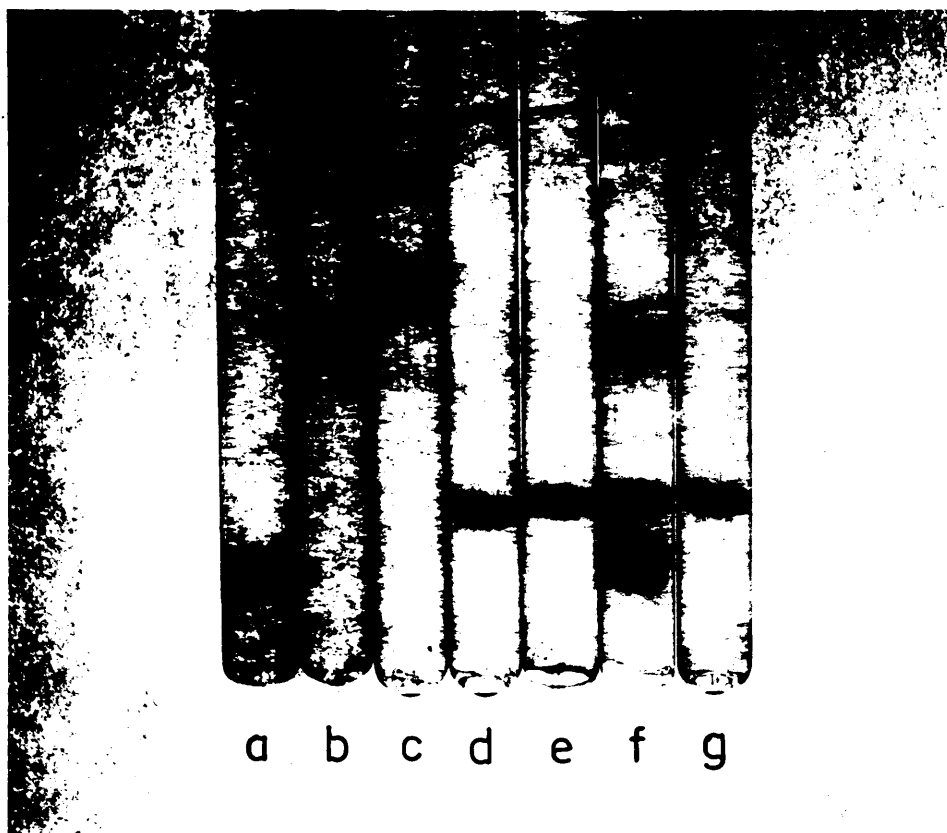


Figura 1.- Electroforesis de zona en geles de poliacrilamida del 7,5% en 0,1% de SDS: a, citocromo c; b, ovoalbúmina; c, seroalbúmina bovina; d, BR delipidada por cromatografía en columna; e, BR delipidada con solventes orgánicos; f, ovoalbúmina, MP y citocromo c; g, MP. (Para condiciones experimentales ver 2.3.1.).

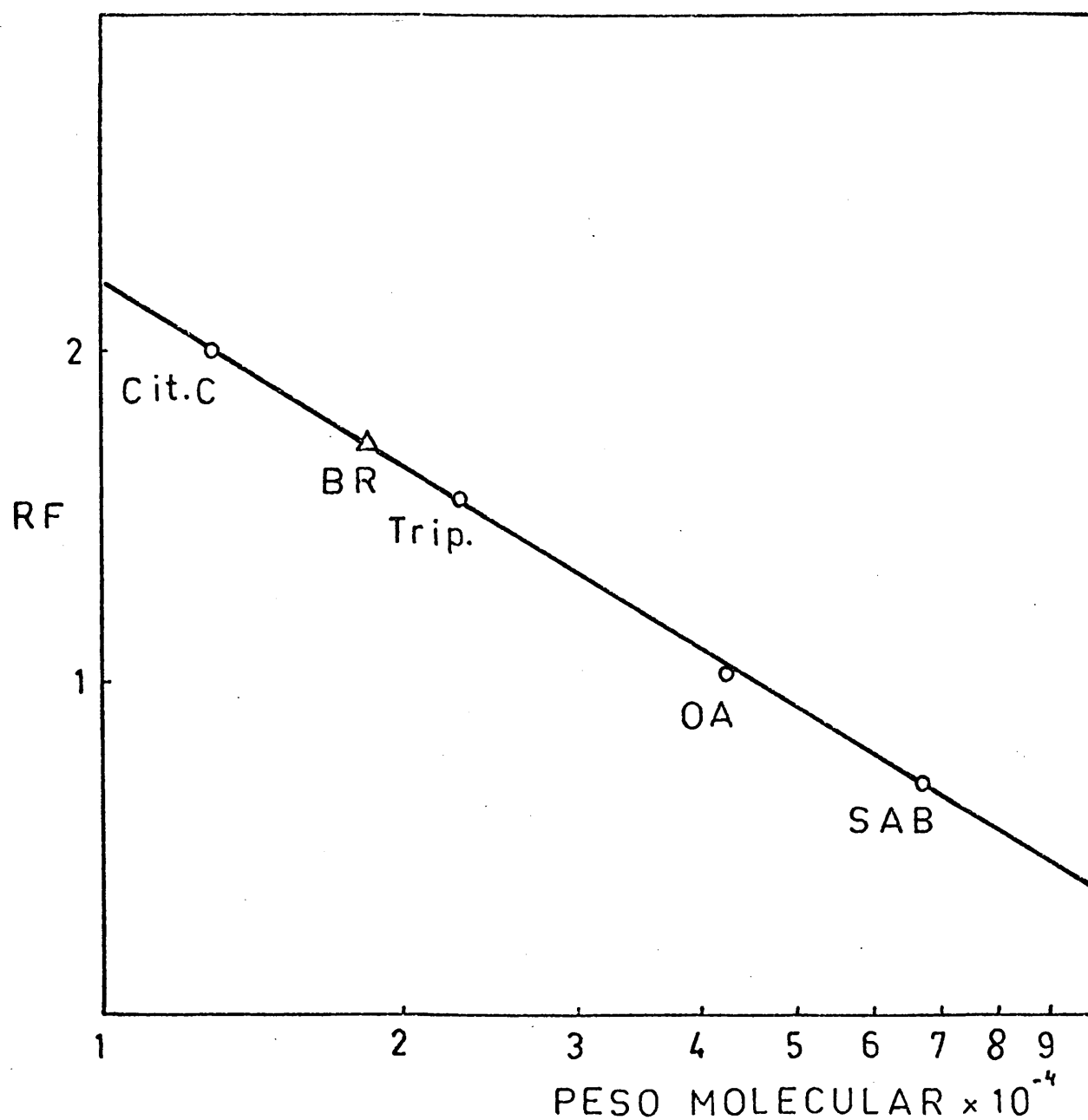


Figura 2.- RF de MP, BR y proteínas standard de calibración obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida del 7,5% en 0,1% de SDS, frente al logaritmo de los pesos moleculares.

La figura 3 muestra la relación lineal entre densidad y concentración.

3.1.3. Relación proteína : lípido y contenido en fósforo.

Utilizando BSA como standard, el método de Lowry sólo valoró un 75,3% del peso seco de BR en agua obtenido por gravimetría en vacío y 58° C, a partir de lo cual calculamos un coeficiente de transformación de proteína valorada por Lowry en BR de 1,327. Igualmente el método colorimétrico sólo valoró un 60,4% del peso seco de MP como proteína. Si transformamos este 60,4% en proteína de BR con el factor obtenido anteriormente, encontramos que BR representa un 91% del peso seco de MP.

Por otra parte, los lípidos extraídos tras delipidar MP según el método de Bligh y Dyer, se llevaron a sequedad en atmósfera de nitrógeno, se redisolviéron dos veces en éter, y se determinó su peso seco constante, representando éste un 14,5% del peso seco total de MP.

A partir de las determinaciones anteriores y tomando valores medios, es decir 11,8% de lípidos y 88,2% de proteína, la relación proteína:lipido obtenida es 7,4 (P/P). Dado que la masa molecular de BR obtenida por equilibrio de sedimentación es de 34.000 (3.4.4.), tomando un peso molecular medio de 1.000 para los lípidos de MP, encontramos que en MP por cada molécula de proteína existen cinco moléculas de lípidos.

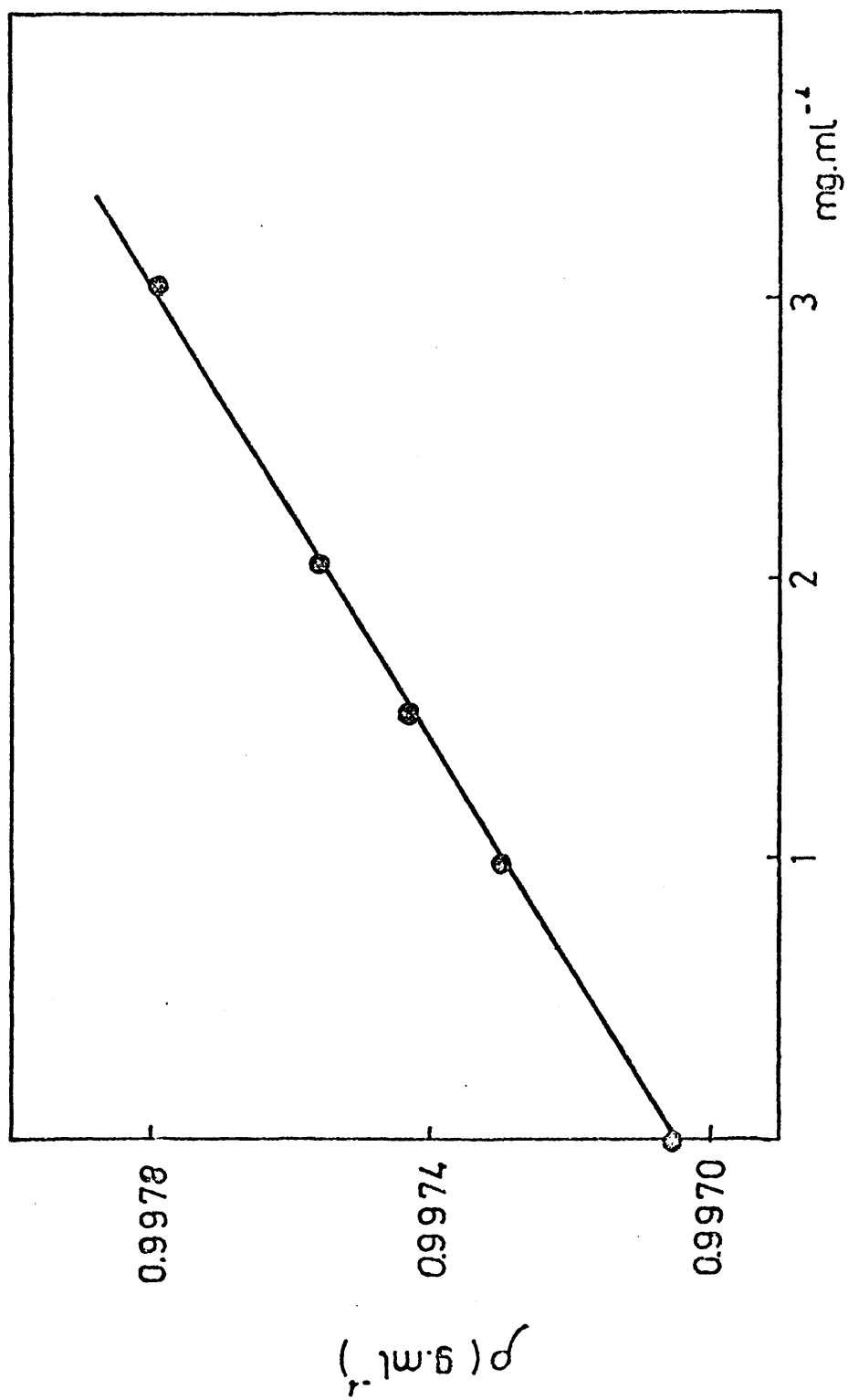


Figura 3.- Relación densidad-concentración de MP en agua.

El contenido en fósforo hallado en MP es del 1% en peso. La figura 4 muestra la linealidad entre contenido en fósforo y peso seco de MP. Para BR en agua, se encontró que el 0,1% de su peso corresponde a fósforo, lo cual implica 1,09 átomos de fósforo por mol de proteína. Los lípidos deben contener el fósforo restante, es decir el 91% del total.

3.1.4. Relación proteína:retinal y contenido en retinal

La cantidad de retinal determinado analíticamente en MP ha sido 0,48% en peso, correspondiendo por tanto a una relación molar proteína:retinal 1:0,57 tomando como peso molecular de BR, 34.000; y contenido - proteico en MP, 88,2%.

La delipidación de MP por el procedimiento - de Bligh-Dyer, extrae totalmente los lípidos, pero no ocurre así con el retinal. Este queda en una pequeña - parte unido a la proteína como se demuestra por fluorescencia y determinación analítica del retinal en BR en 1% de SDS y BR en agua, en donde el retinal hallado constituye una décima parte del total extraído en MP, es - decir 0,05 y 0,04% respectivamente.

La figura 5 muestra los espectros de emisión y excitación de BR en H₂O y BR en 1% de SDS, con las - bandas correspondientes a la fluorescencia del retinal,

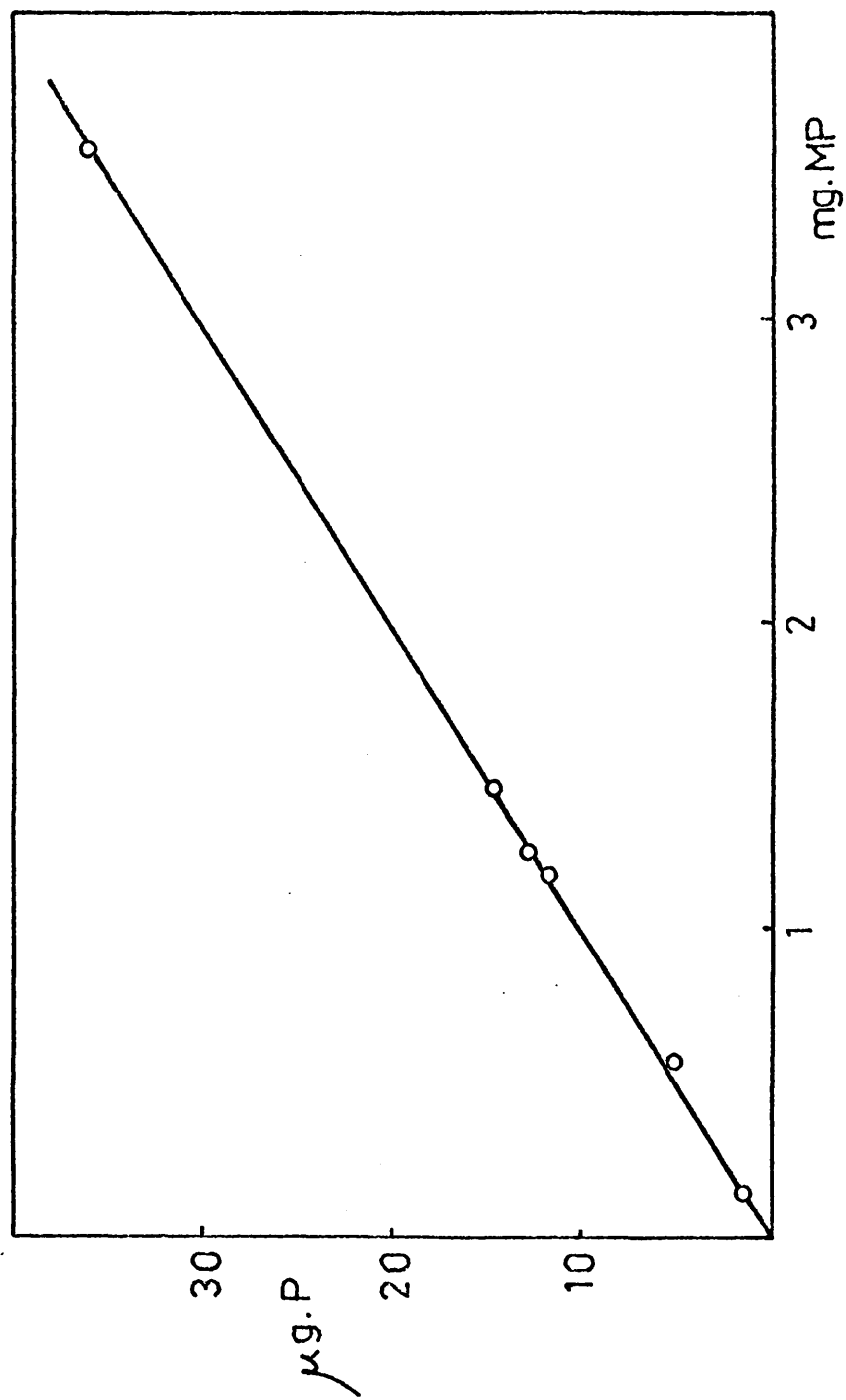


Figura 4.- Linearidad entre contenido en fósforo (μ gr.) y peso seco (mg.) de MP.

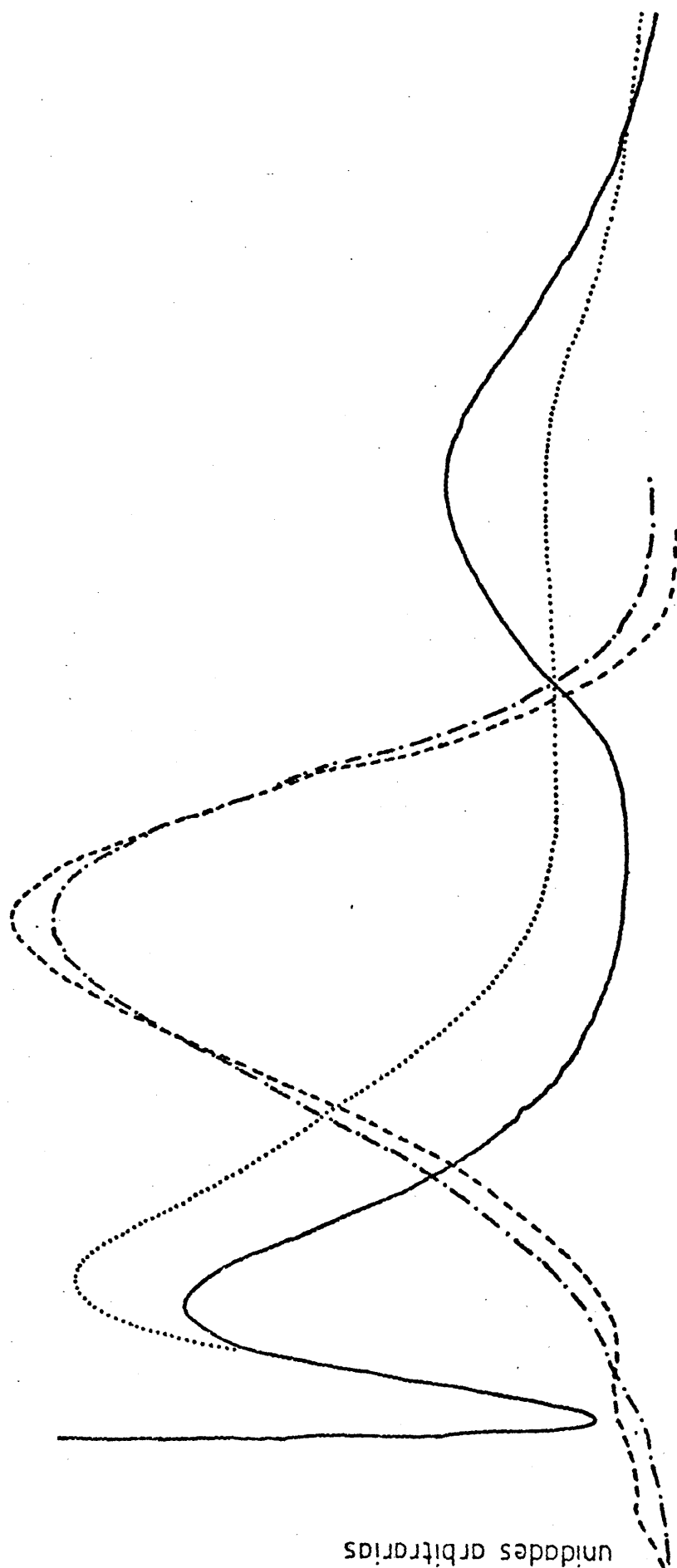


Figura 5.- Espectros de fluorescencia de BR en 1% de SDS y en agua. BR en 1% de SDS (λ_{máx.} emisión = 460 nm (—), λ_{máx.} excitación = 280 nm (.....)). BR en agua (λ_{máx.} emisión = 450 nm (----), λ_{máx.} excitación = 280 nm (—)).

cuyas posiciones aparecen recogidas en la siguiente tabla.

TABLA I

Máximos de excitación y emisión de proteína y retinal
para BR en 1 % de SDS y en agua

	$\lambda_{\text{max. de excitación (nm)}}$	$\lambda_{\text{max. de emisión (nm)}}$	Bandas de proteína	Bandas de retinal
BR 1% SDS	280		312	455
		460	287h.	375
BR en H ₂ O	280		307	455
		450	268h. 280h.	374

3.1.5. Coefficientes de extinción molar de BR en distintas condiciones y longitudes de onda

En la figura 6 se muestran las curvas de calibración de absorbancias de MP en agua, BR en agua, y BR en 1% de SDS, frente a concentraciones en peso seco. A partir de ellas, se han obtenido los coeficientes de extinción que aparecen en la tabla II. El contenido proteico considerado para MP ha sido 88,2%, y la masa molecular de BR 34.000.

TABLA II

	$\epsilon_{568} (1./\text{mol.cm.})$	$\epsilon_{280} (1./\text{mol.cm.})$
BR en MP H ₂ O	55.000	116.000
BR H ₂ O	-	42.000
BR 1 % SDS	-	103.000

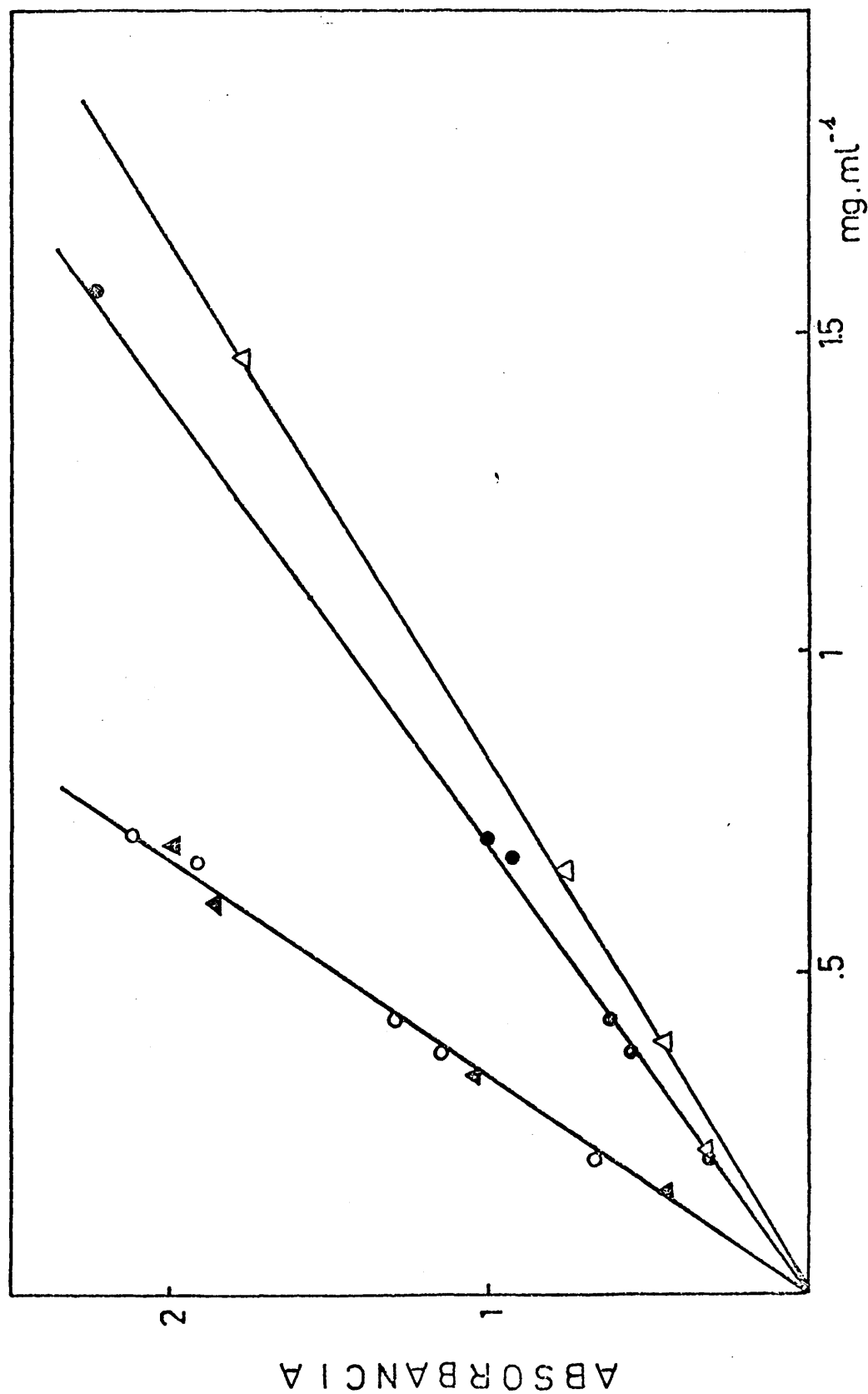


Figura 6.- Absorbancia a 280 nm de MP en agua (○), BR en 1% de SDS (Δ), BR en agua (●), y absorbancia a 568 nm de MP en agua (●), frente a sus concentraciones respectivas en peso seco.

3.1.6. Discusión

Los primeros resultados analíticos obtenidos en nuestro laboratorio, no concordaban con los publicados hasta entonces para MP de H.H. (1). Nosotros encontramos para BR por electroforesis en gel en SDS una masa molecular relativa de 18.700 ± 300 , y analíticamente un contenido de retinal en MP de 0,48% en peso. Mediante determinaciones de peso seco, se obtuvo una relación proteína-lípido de 7,4/1 (P/P) calculándose una relación molar proteína-retinal 1/0,33, valores todos ellos muy alejados de los obtenidos por Oesterhelt y Stoeckenius (1), con idénticos métodos.

Por otra parte, nuestros resultados concordaban con los obtenidos para la MP de Halobacterium Cutirubrum (H.C.) (2), respecto a peso molecular de BR, contenido total en MP de fósforo y retinal y densidad de MP en agua.

Recientemente (3), los autores de las comunicaciones (1) (2) afirman que analítica y estructuralmente MP de ambas halobacterias es idéntica (falta estudiar la composición de aminoácidos), y concluyen que los valores correctos son los de (2).

La tabla III resume los datos analíticos correspondientes a las comunicaciones (1) (2) (3) y los obtenidos en la presente tesis; la columna (A) contiene nuestros datos utilizando la masa molecular relativa obtenida mediante electroforesis en gel en SDS, y la columna (B) aquellos utilizando el peso molecular obtenido por equilibrio de sedimentación (3.4.4.).

TABLA III

	(1) Oesterheld y otros (1971)	(2) Kushwava y otros (1975) (a)	(3) Kushwava y otros (1976)	(A)	Presente tesis (B)
M de BR	26.000 ± 300	19.000 ± 800	19.300 ± 200	18.700 ± 300	34.000 ±
Prot./líp. (P/P)	3/1	4/1	4/1		7,4/1
Prot./líp. (mol/mol)	1/10 - 1/13	1/5	1/5	1/3	1/5
Prot./ret. (mol/mol)	1/1	1/0,43	1/0,43	1/0,33	1/0
At. de P/ mol de BR	-	1,8	1,8	0,6	1,0
ρ_{H_2O} , 25°C.	1,18	1,244 (b)	-		1,2464
$\epsilon_{568}^{de BR}$	54.000	48.000 (c)	-		55.0
$\bar{\nu}_2$	-	0,736 (d)	-		0,815

(a) datos obtenidos para MP de H.C.; (b) a 5°C.; (c) 565 mm.; (d) obtenido a partir de la composici
de aminoácidos.

Prot. = proteína

Líp. = lípido

Ret. = retinal

At. = átomo

A partir de determinaciones de peso seco, en (2) encuentran que el 20 % en peso de MP corresponde a lípidos, y que éstos contienen el 79% del fósforo total de MP; el resto debe quedar unido a la proteína (1,8 - átomos de fósforo por mol de BR). Sin embargo si consideramos como peso molecular exacto el obtenido por equilibrio de sedimentación, su contenido de fósforo supondría 3,3 átomos por mol de proteína. A partir del contenido de fósforo determinado por nosotros en BR en agua (0,1% en peso), el peso molecular antes mencionado (34.000) y la proporción de proteína en MP (88,2%), se obtiene que la proteína tiene 1 átomo de fósforo por mol de BR. El enlace debe de ser covalente pues permanece tras extracción con solventes orgánicos, solubilización en 1% de SDS y diálisis exhaustiva.

Sin embargo, no deja de ser curioso el hecho de que a pesar de las distintas relaciones proteína-lípidos (P/P) obtenidas en (2) y por nosotros, y los distintos pesos moleculares empleados al calcular la relación molar proteína-lípido (es decir 19.300 y 34.000), se obtenga que en una unidad elemental de MP existan - cinco moléculas de lípidos por cada mol de proteína.

También hay que señalar la casual coincidencia del valor de ϵ_{568} obtenido para BR en MP en (1) a partir del contenido en retinal y considerando según - se muestra en la tabla III, que la relación molar pro-

A partir de determinaciones de peso seco, en (2) encuentran que el 20 % en peso de MP corresponde a lípidos, y que éstos contienen el 79% del fósforo total de MP; el resto debe quedar unido a la proteína (1,8 - átomos de fósforo por mol de BR). Sin embargo si consideramos como peso molecular exacto el obtenido por equilibrio de sedimentación, su contenido de fósforo supondría 3,3 átomos por mol de proteína. A partir del contenido de fósforo determinado por nosotros en BR en - agua (0,1% en peso), el peso molecular antes mencionado (34.000) y la proporción de proteína en MP (88,2%), se obtiene que la proteína tiene 1 átomo de fósforo por mol de BR. El enlace debe de ser covalente pues permanece tras extracción con solventes orgánicos, solubilización en 1% de SDS y diálisis exhaustiva.

Sin embargo, no deja de ser curioso el hecho de que a pesar de las distintas relaciones proteína-lípidos (P/P) obtenidas en (2) y por nosotros, y los distintos pesos moleculares empleados al calcular la relación molar proteína-lípido (es decir 19.300 y 34.000), se obtenga que en una unidad elemental de MP existan - cinco moléculas de lípidos por cada mol de proteína.

También hay que señalar la casual coincidencia del valor de ϵ_{568} obtenido para BR en MP en (1) a partir del contenido en retinal y considerando según - se muestra en la tabla III, que la relación molar pro-

teína-retinal es 1:1 y el peso molecular de BR 26.000, con el obtenido por nosotros por métodos totalmente distintos (3.1.5.).

Falta sólo comentar la relación molar BR-retinal que aparece en (B) (tabla III), es decir 1:0,57. Ello supone que por cada dos moléculas de proteína solamente una está unida al retinal formando la base de Schiff, es decir aproximadamente la mitad de lo obtenido en un principio según (1), donde encontraban una relación molar proteína-retinal 1:1.

3.2. SOLUBILIZACION DE MP Y BR EN SOLUCIONES ACUOSAS CON DETERGENTES

3.2.1. Isotermas de unión detergente-MP, mediante centrifugación. Desnaturalización de BR en agua con detergentes.

Como era de esperar, de entre los detergentes empleados, el más efectivo fue el SDS, tanto en cuanto a solubilización como a desnaturalización.

En la figura 7 A, aparece una isoterma de unión SDS-MP a 25° C, donde muestras conteniendo 1,46 mg. de peso seco de MP en 1 ml. se incubaron durante una noche con concentraciones crecientes de SDS, centrifugándose después a 160.000 xg 90 min. y 25° C. y considerando que el material que contenía el sobrenadante, correspondía al material solubilizado. Para calcular las relaciones molares existentes en las muestras se tomaron los siguientes pesos moleculares: 34.000 para BR (3.4.4.); 1.000 para los lípidos de MP (2) y como se vió en (3.1.3.) que por cada molécula de BR existen aproximadamente cinco moléculas de lípidos, se tomó por tanto como peso molecular medio de una unidad elemental de MP (BR-lípidos) un valor de 39.000. En esta isoterma la saturación se alcanza a una relación molar SDS/ (BR-lípido) aproximadamente de 400, es decir una relación 3/1 (P/P) aproximadamente.

Los datos obtenidos, se analizaron considerando que el proceso se puede representar por una isoterma ti

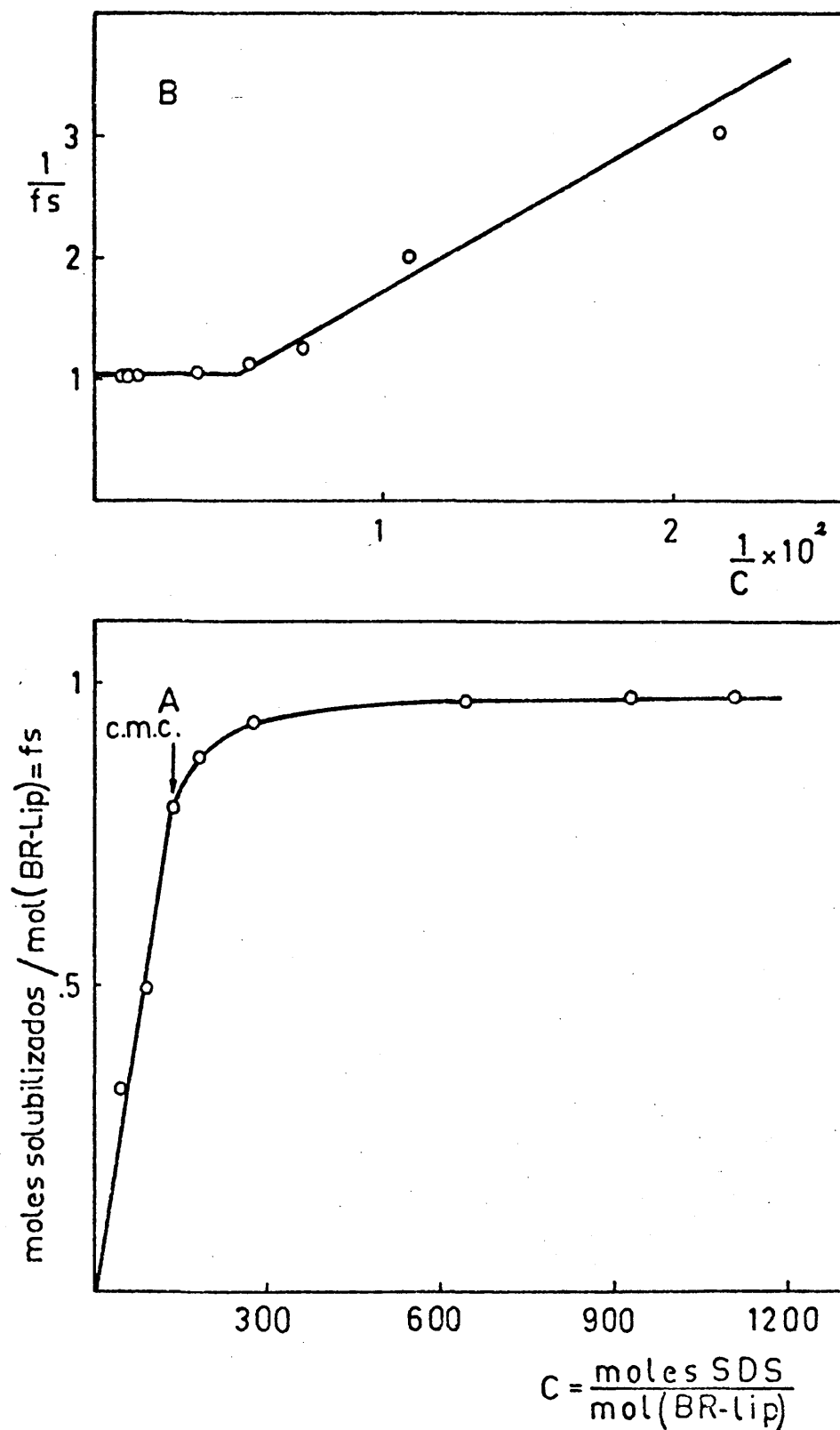


Figura 7.- Isoterma de solubilización de MP con SDS a concentración de MP constante: 1,46 mg. de peso seco en 1 ml. (ver texto 3.2.1.).

po Langmuir, y utilizando representaciones de dobles re
cíprocos según la ecuación:

$$\frac{4}{\bar{y}} = \frac{1}{y \text{ máx.}} + \frac{1}{y \text{ máx.} \cdot K} \cdot \frac{1}{C} \quad (1)$$

donde \bar{y} , grado aparente de unión, en este caso frac-
ción de solubilización (fs) es función de C, relación -
molar SDS/ (BR-lípido); y máx. representa el nivel má-
ximo aparente de saturación, en este caso fracción máxi-
ma de solubilización; y K es una constante de asociación
aparente.

Para la isoterma mencionada, dicho análisis -
aparece representado en la figura 7 B, y los resultados
obtenidos son 0,97 para la fracción máxima de solubili-
zación y $7,43 \times 10^{-3}$ para la constante K de asociación
aparente.

En la figura 8 mostramos una isoterma realiza-
da a concentración de SDS constante (1 mg. en 1 ml.), don-
de aparece la fracción de solubilización (fs) en función
de concentraciones crecientes de proteína. En la figura
7 A y 8 hay un punto común que corresponde a una rela-
ción molar SDS/ (BR-lípido) de 92,8 o lo que es lo mis-
mo 1/1,46 (P/P), para el que encontramos una solubiliza-
ción de 0,49 y 0,48 respectivamente.

La fracción solubilizada pierde el color púr-
pura y se torna amarilla, presentando un máximo de ab-
sorción a 397 nm atribuible al retinal (figura 9). Esta

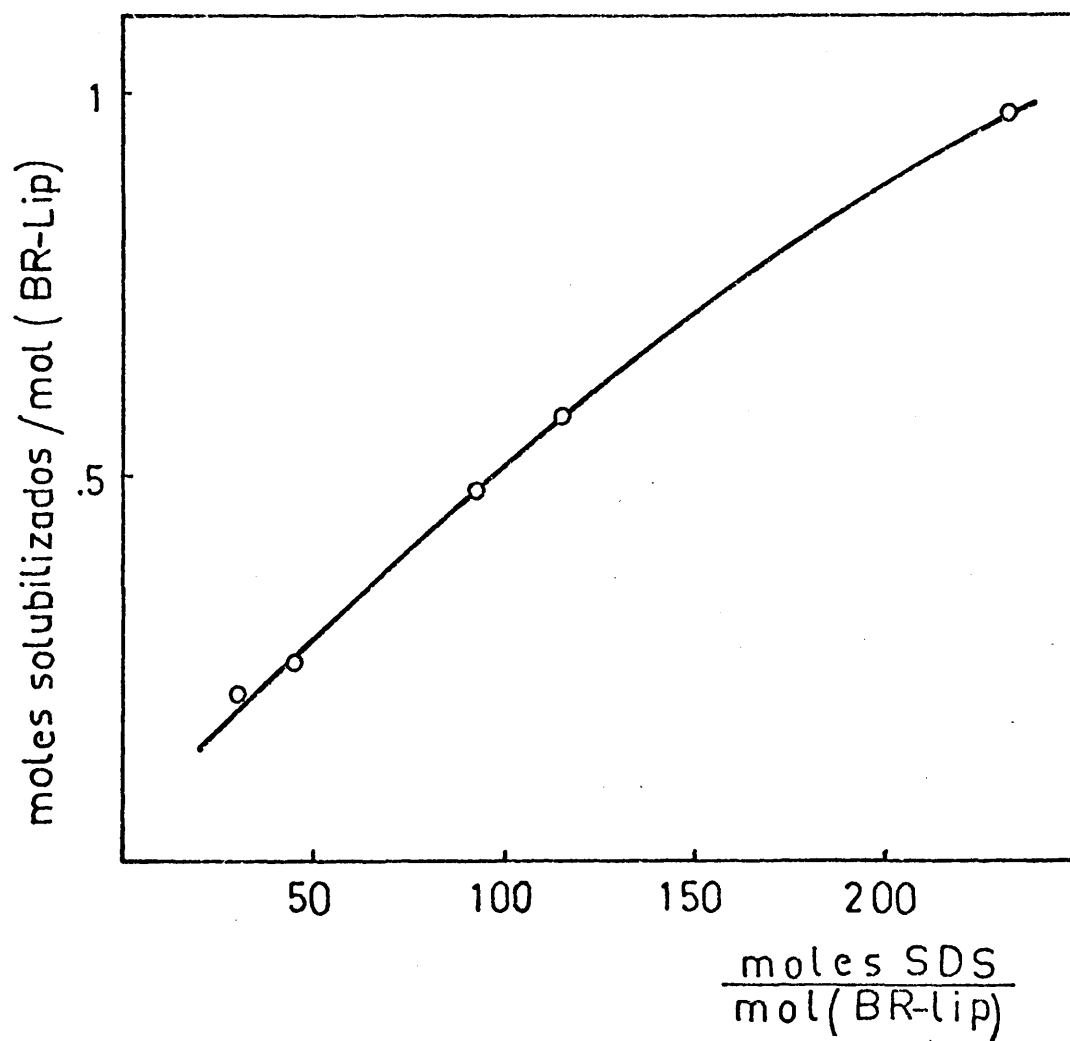


Figura 8.- Isoterma de solubilización de MP con SDS a concentración de SDS constante: 1 mg. en 1 ml. (ver texto 3.2.1.).

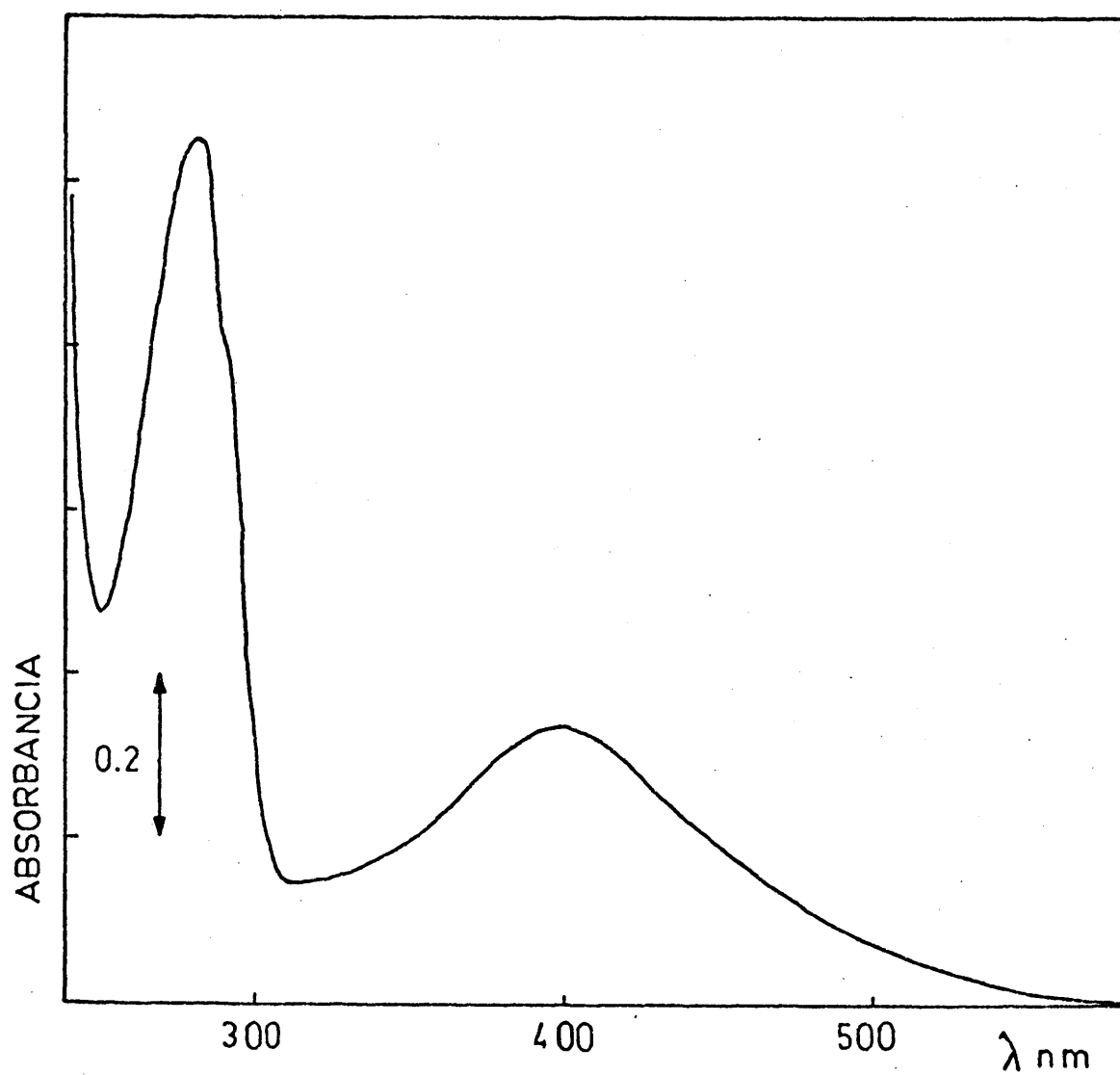


Figura 9.- Espectro de absorción de MP en tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, 1 % de SDS.

destrucción del complejo púrpura es una expresión más de la desnaturalización total de BR y desintegración de MP.

El máximo de emisión propio de proteínas en MP se desplaza unos 16 nm hacia longitudes de onda mayores en MP en 1% de SDS donde además aparece un nuevo máximo de emisión a 452 nm. (tabla IV).

TABLA IV

Posiciones del máximo correspondiente a la emisión de proteínas en MP en agua, y máximos de excitación y emisión de MP en 1% de SDS a distintas longitudes de onda.

	$\lambda_{\text{máx. excitación}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx. emisión}}$ (nm)	posición máximos (nm)
MP en agua	290	.	317
	290		333
	370		452
MP en 1% de SDS		330	292
			270
		460	310
			374

Tanto el TRITON X100 como el DchNa, solubilizaron MP en mucho menor grado. Ambos detergentes merecen un estudio más detallado del que se expone a continuación que aún no hemos podido realizar. Isotermas hechas en idénticas condiciones que con SDS, y trabajando con relaciones MP/DchNa 1/10-1/40 (P/P), sólo alcanzaron solubilización

nes máximas del 15-20% al mismo tiempo que desnaturalizaron el complejo púrpura del material solubilizado. El pellet residual quedaba aparentemente sin modificar, al menos desde el punto de vista espectroscópico. +

Con TRITON X100, la fracción de material solubilizado depende en alto grado de la temperatura y tiempo de interacción. La isoterma que aparece en la figura 10 fue realizada trabajando a concentración constante - de 1,46 mg. de MP en 1 ml.; la cantidad de detergente - varió entre 0,4 y 3% (V/V) y la incubación duró 4 días. También en este caso, la fracción solubilizada de color amarillo se había desnaturalizado.

3.2.2. Valoración microcalorimétrica de MP, lípidos de MP y BR en agua con SDS

Como complemento del proceso de solubilización de MP con SDS, se procedió a estudiar las entalpías de unión de dicho detergente con MP y sus elementos constituyentes, es decir BR en agua y lípidos de MP en forma de vesículas. Para calcular dichas entalpías, se utilizaron las masas moleculares adoptadas en (3.2.1) y los datos se analizaron según la ecuación (1), en la que en este caso \bar{y} es la entalpía de unión.

Las figuras 11, 12 y 13 muestran las isotermas correspondientes a las entalpías de unión de BR en agua, MP, y lípidos, con SDS y las representaciones de dobles recíprocos correspondientes. De ellas se han ob-

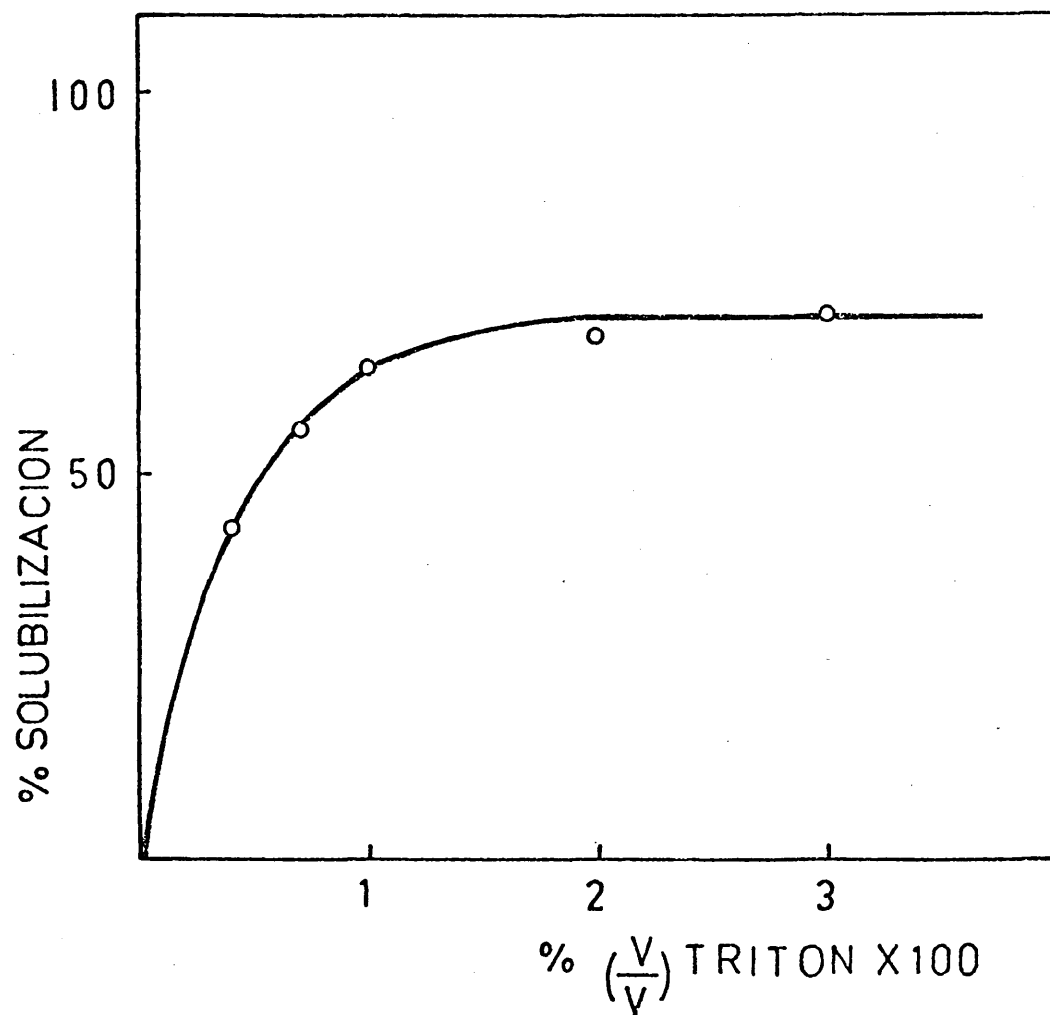


Figura 10.- Isoterma de solubilización de MP con TRITON X100 a concentración de MP constante: 1,46 mg. de peso en 1 ml. (ver texto 3.3.1.).

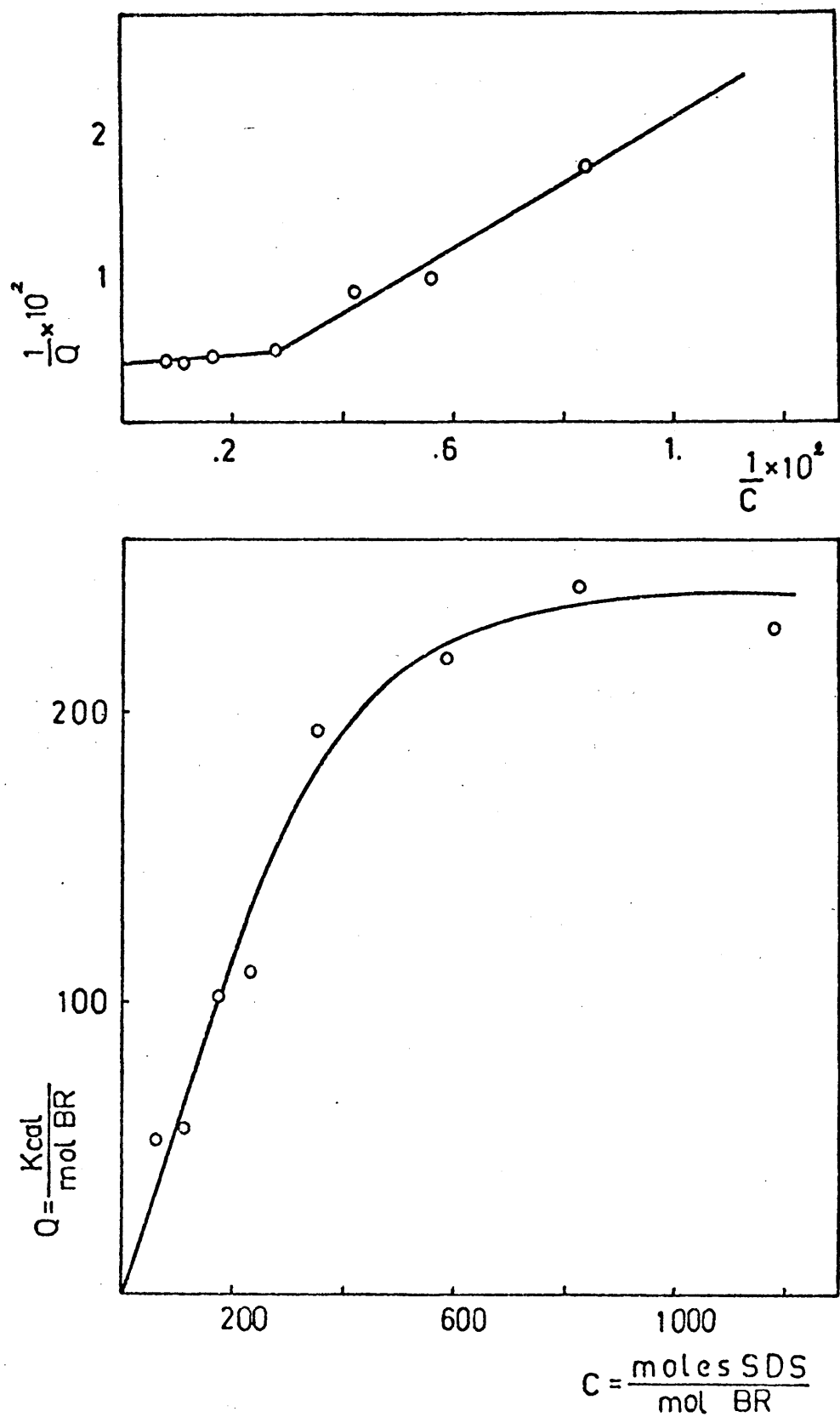


Figura 11.- Isoterma calorimétrica de unión SDS-BR en agua a concentración de BR constante: 1,5 mg. de peso seco en un volumen de reacción final de 5 ml.

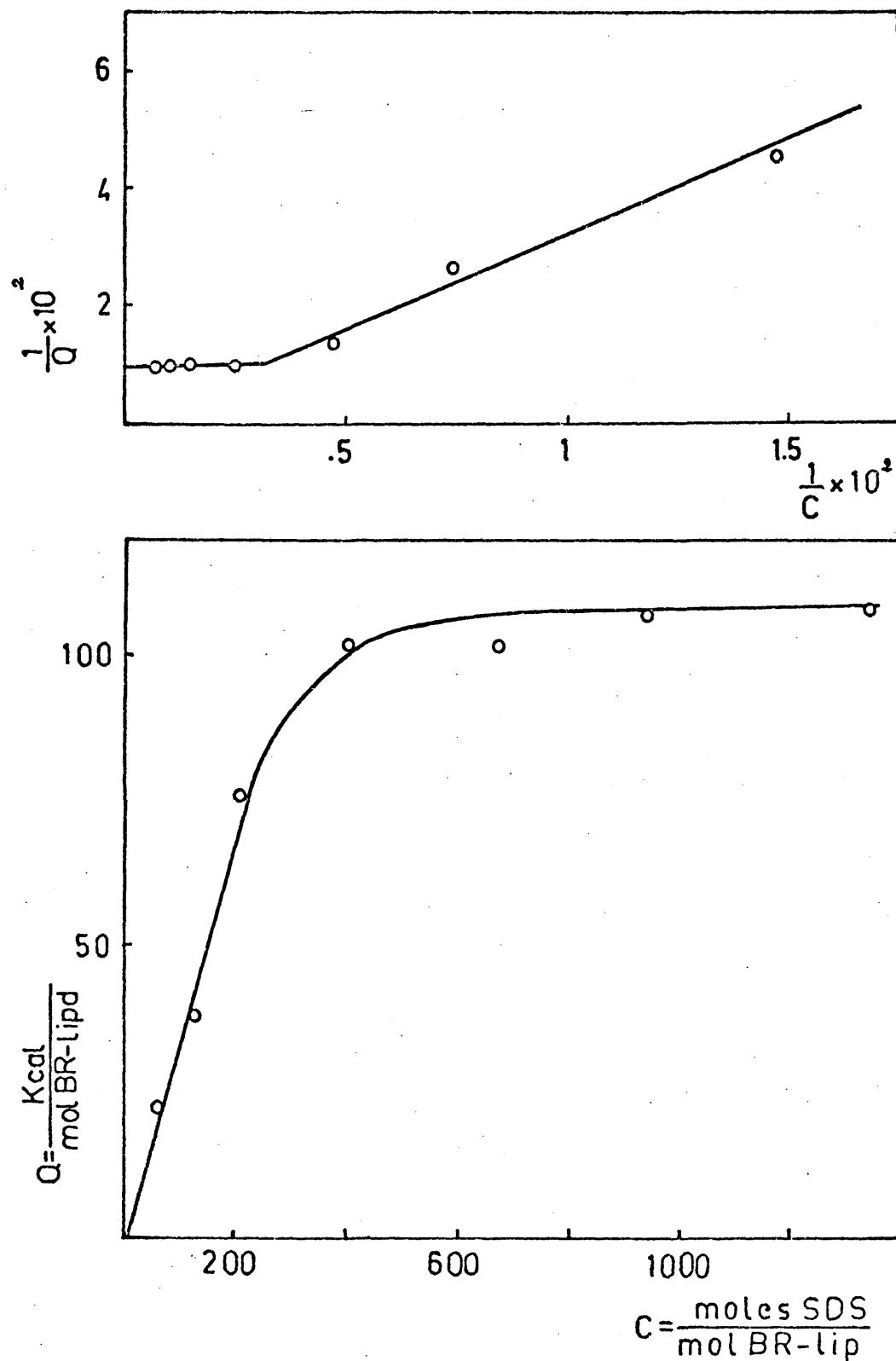


Figura 12.- Isoterma calorimétrica de unión SDS-MP a concentración de MP constante: 2,19 mg. de peso seco en un volumen de reacción final de 5 ml.

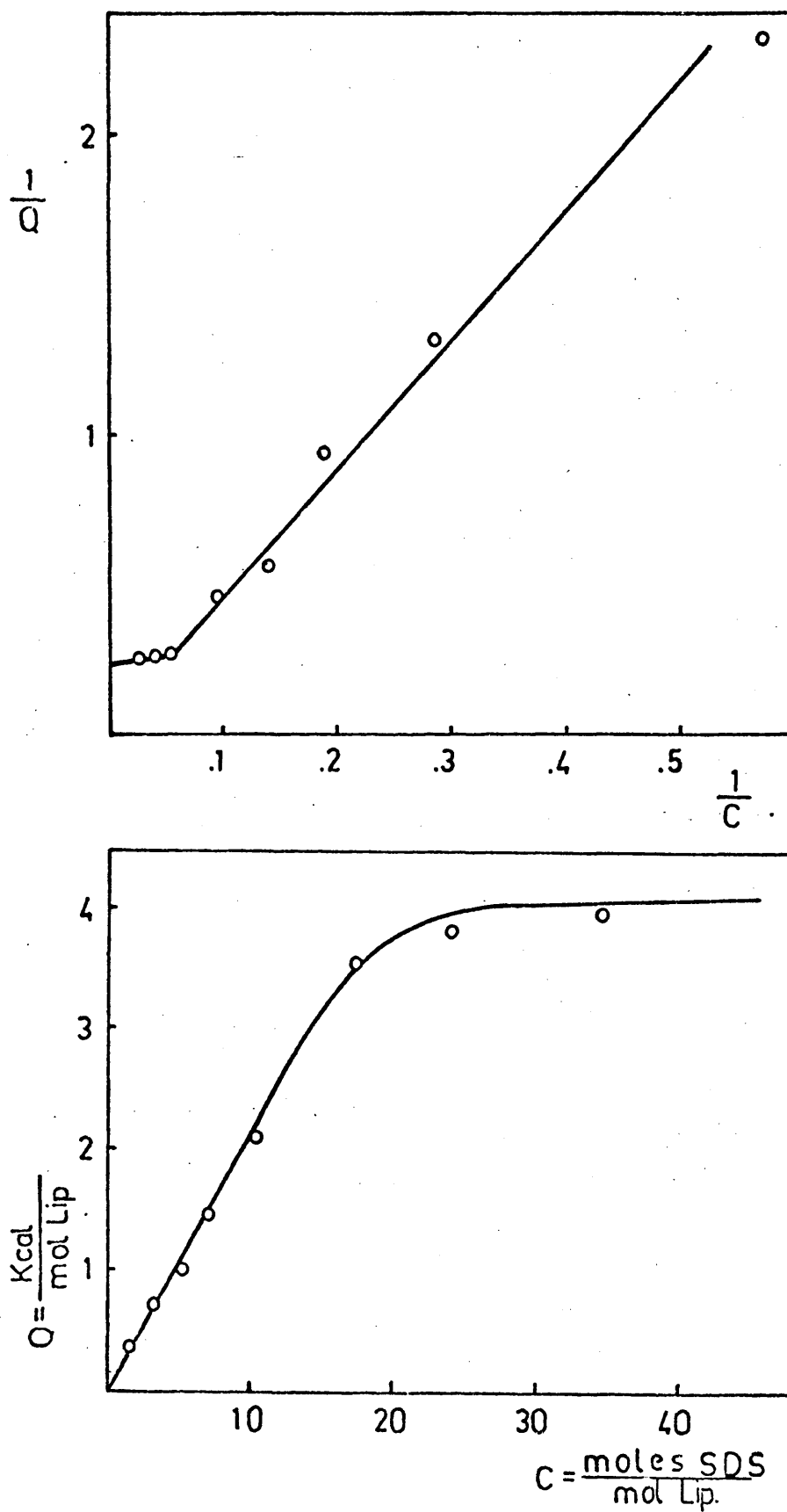


Figura 13.- Isoterma calorimétrica de unión SDS-lípidos de MP a concentración de lípidos constante: 1,5 mg. de peso seco - en un volumen de reacción final de 5 ml.

tenido las entalpías molares y constantes de asociación aparentes que se recogen en la tabla V.

TABLA V

Entalpías molares de unión de SDS a MP, BR en agua y lípidos de MP, y constantes de asociación aparentes.

	- ΔH (Kcal./mol)	K (cte. de asociación aparente).
MP (BR-lípidos)	109	$2,81 \times 10^{-3}$
BR en agua	244	$1,38 \times 10^{-3}$
Lípidos de MP	4,2	$55,8 \times 10^{-3}$

De estos datos se deduce que la contribución total de los lípidos a la entalpía de unión SDS-MP debe ser muy pequeña si en ambos casos, liposomas y MP, adoptan la misma estructura lamelar. Igualmente dado que sólo existen cinco moles de lípido por mol de proteína, el material en agua (BR) al unirse con el SDS libera aproximadamente 2,8 veces más calor que cuando dicha proteína se encuentra en su membrana natural.

3.2.3. Segregación lípido-proteína mediante gradientes de densidad y cromatografía en columna

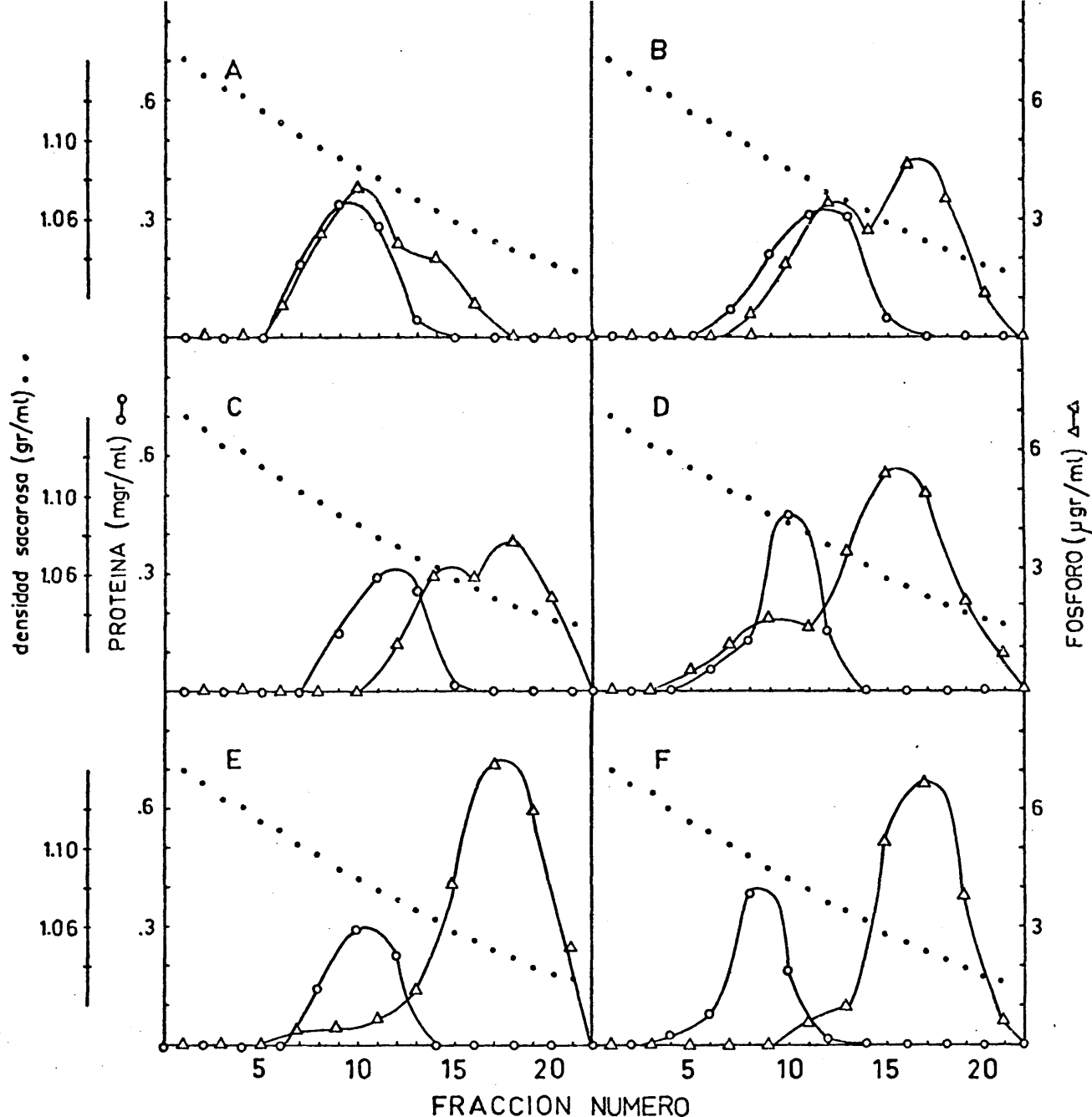
Una vez estudiado, según el criterio de material no sedimentable por centrifugación la solubiliza

ción de MP con SDS, y teniendo en cuenta que en principio la solubilización de cualquier membrana con detergente - lleva implícita la formación de micelas lípido-detergente, y estructuras micelares mixtas lípido-proteína-detergente se procedió a estudiar la cantidad de detergente necesaria para conseguir una segregación de lípidos y proteínas en estructuras micelares independientes, tratando de conocer - cuales serían los pasos intermedios en el proceso de solubilización.

En la figura 14 se muestran los perfiles de proteína y lípidos a lo largo de gradientes de sacarosa, para muestras solubilizadas con SDS a concentraciones crecientes.

La delipidación de BR a concentraciones crecientes de SDS, consiste en la segregación de lípidos de los complejos lípido-proteína-detergente formados como estructuras intermedias al desintegrarse la membrana. A medida que la concentración de detergente se incrementa, los lípidos en contacto con la proteína se intercambian por detergente, resultando en la formación de micelas lípido-SDS y proteína-SDS independientes, distintas en tamaño, densidad, carga, afinidad con el medio solvente, etc. por tanto de fácil separación.

En la tabla VI aparecen las fracciones en tanto por ciento para proteína y lípido que permanecen como complejos lípido-proteína-detergente en cada gradiente, así



gura 14.- Fraccionamiento de muestras de MP (2,92 mg. en 1 ml.) en SDS en gradientes de sacarosa. Gradiente A, SDS 1,38 mM, muestra solubilizada y dializada en SDS 3,46 mM. Gradiente B, SDS 3,46 mM, muestra solubilizada y dializada en SDS 3,46 mM. Gradiente C, SDS 3,46 mM, muestra solubilizada en SDS 34,6 mM y dializada en SDS 3,46 mM. Gradiente D, SDS 6,93 mM, muestra solubilizada y - dializada en SDS 6,93 mM. Gradiente E, SDS 17,3 mM, muestra solubilizada y dializada en SDS 17,3 mM. Gradiente F, SDS 34,6 mM, muestra solubilizada y dializada en SDS 31,2 mM. Fracciones numeradas de fondo a cima de gradiente. Para condiciones de centrifugación (ver 2.2.4.3.).

como la densidad aproximada correspondiente a cada máximo. El criterio consistió en determinar la fracción de las áreas bajo los perfiles de proteína y lípido que se solapan a lo largo de cada gradiente.

TABLA VI

Gradiente	% proteína	% lípidos	ρ proteína - SDS	ρ com- plejo	ρ lípidos - SDS
A	97,6	67,2	-	1.074	-
B	68,1	38,5	-	1.063	-
C	38,9	20,6	-	1.068	-
D	62,5	22,5	-	1.080	1,055
E	33,3	9,9	1,083	-	1,047
F	5,4	2,3	1,093	-	1,049

Vemos pues, que en el gradiente A donde la relación proteína/SDS en la muestra es de 2/1 (P/P) y la concentración de SDS en el gradiente es de 1,38 mM prácticamente toda la proteína está formando parte de estas estructuras micelares mixtas lípido-proteína-detergente, y el 33% de los lípidos existe ya como entidad independiente. Al ir disminuyendo las relaciones proteína/SDS, pasamos por estados intermedios (gradientes B,C,D) con micelas proteína-detergente, proteínas-lípidos-detergente y lípido-detergente, alcanzándose la segregación lípido-proteína total en el gradiente F con una concentración de SDS 31,2 mM (figura 15).

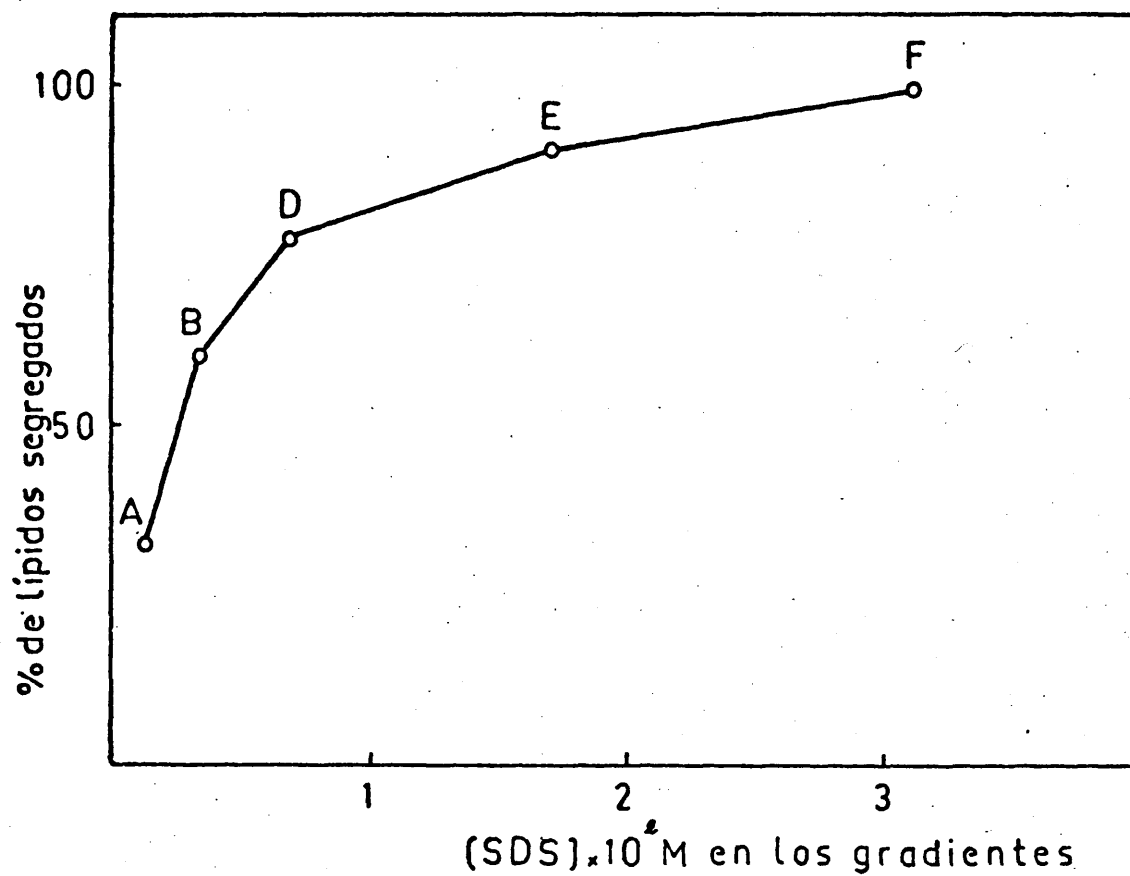


Figura 15.- Segregación de lípidos en tanto por ciento, frente a la concentración de SDS en los gradientes cuyos perfiles y características se muestran en la figura 14.

Si bien la interacción proteína-SDS es reversible, el tiempo necesario para equilibrar una muestra mediante diálisis es bastante largo (al menos tres semanas), lo que se pone de manifiesto en los resultados de los gradientes B y C cuya única diferencia consistió en que en el primero la muestra en SDS 3,46 mM había sido dializada frente a dicha concentración, mientras que en el segundo la muestra en SDS 34,6 mM había sido dializada frente a SDS 3,46 mM, pero durante un tiempo no suficientemente largo como para alcanzar el equilibrio.

Mediante cromatografía en columna con sephadex G-100 también se consiguió segregar lípidos de proteínas en estructuras micelares independientes. La columna se equilibró con tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, 1% de SDS. Fracciones de MP comprendidas entre 10 y 40 mg. se solubilizaron en 2 ml. del tampón anterior y se dializaron frente al mismo durante 8 días, al cabo de los cuales se aplicaron a la columna.

De acuerdo con los controles analíticos del eluato las dos fracciones lipídica y proteica se superponían, aunque la proteica salía ligeramente desplazada al frente, por lo que se procedió a un reciclado triple, después de ésto se consiguió delipidar BR y estudiar ambas fracciones separadamente.

3.2.4. Discusión

Los dos métodos utilizados para seguir la interacción del SDS con MP, sedimentación y calorimetría, son coincidentes en cuanto a que el nivel de saturación se alcanza a una relación molar SDS/ (BR-lípido) de alrededor de 400. Por otro lado a saturación vemos por se dimentación que la fracción de solubilización es prácti camente 1, y por calorimetría que la entalpía de solubi lización es de 109 Kcal. por mol de complejo (BR-lípido₅). Sin embargo estos dos métodos siguen distintamente el - curso de la interacción detergente membrana ya que por sedimentación se alcanza una fracción de solubilización de 0,5 a una relación molar SDS/sustrato de 90 mientras que el valor de semisaturación por calorimetría se encuentra a una relación molar de 160. Lo que se podría - interpretar como que el material que se va solubilizando no está todavía saturado de SDS y es posteriormente cuando alcanza la saturación.

La figura 8, pone de manifiesto que en - el proceso de solubilización, la relación SDS/MP es un factor más indicativo que la concentración total de SDS como fue señalado anteriormente (4). En la figura 7, ve mos que la solubilización comienza a relaciones SDS/MP muy bajas, aumentando a medida que aumenta dicha relación, hasta alcanzar el nivel de saturación. A una concentración total de SDS igual a 5,2 mM, a la cual comien

zan a formarse micelas de detergente en el tampón empleado, corresponde una fracción de solubilización superior a 0,8 (figura 7) y una saturación de la interacción SDS-MP seguida calorimétricamente (figura 12), de lo que deducimos que es el monómero de SDS el que interacciona con MP y por tanto el responsable de su solubilización, al igual como se ha visto anteriormente para otras membranas y proteínas solubles (6) (7). Se justifica además la unión de la forma monomérica mediante un análisis termodinámico sencillo. El calor de micelización del SDS es 0,03 Kcal/mol (8); el número de monómeros por micela oscila entre 62 y 120 (4); y el valor de la entalpía máxima de solubilización de la MP con SDS es de 109 Kcal. por mol de complejo (BR-lípido₅), que como ya señalamos antes se alcanza aproximadamente a una relación molar SDS/ (BR-lípido₅) de 400, por tanto la solubilización de MP es un proceso energéticamente mucho más favorable que la micelización.

Recientemente, se ha estudiado la delipidación de MP (9) (10), mediante los detergentes bromuro de dodeciltrimetilamonio a pH = 3 y oxido de dimetildodecilamina, los cuales extraen el 90-95% de los lípidos de MP sin destruir ni el complejo púrpura ni la estructura cristalina. El material parcialmente delipidado no sedimenta a 48.000 x g, 20 min., pero si lo hace a 200.000 xg y 60 min. Un punto a destacar es que este 5-10% de lípidos re

siduales no solubilizados por dichos detergentes tienen una composición similar a la de los lípidos totales de MP, pero deben jugar un papel estructural importante, ya ~~que~~ al extraerlos el complejo púrpura se destruye. Por tanto, en la MP, con estos detergentes, primero tiene lugar delipidación hasta un 90-95%, y después desnaturalización.

El predominio de proteína en MP, y la red cristalina formada por BR mediante interacciones BR-BR, hace que la rotura de estas interacciones sea la etapa decisiva en el proceso de solubilización de MP, más que la solubilización de los lípidos que existen en poca cantidad y ligados por interacciones relativamente débiles como se deduce de los trabajos anteriormente comentados.

Que el SDS desnaturaliza, delipida y rompe la membrana púrpura hasta destruir las interacciones proteína-proteína se deduce de los espectros de absorción y emisión, de los experimentos de centrifugación en gradientes de densidad, y de los de centrifugación diferencial y analítica.

El espectro de absorción del material solubilizado muestra que ha desaparecido la banda correspondiente al complejo púrpura (568 nm) siendo sustituida por una nueva, atribuible a retinal libre con un máximo a 397 nm. Igualmente, el máximo de emisión se desplaza 15 nm. al rojo, al igual que ocurre (3.5) en liposo-

mas de lecitina de yema de huevo con bacteriorodopsina incorporada en su pared y en donde hemos demostrado mediante dicroísmo circular y dicroísmo con resolución temporal, que la bacteriorodopsina no adopta la estructura cristalina propia de la membrana púrpura.

La evolución de la segregación lípido-proteína por SDS seguida mediante sedimentación en gradientes de densidad, muestra que a concentraciones crecientes de detergente aumenta el porcentaje de lípidos segrega-dos al ir intercambiándose éstos por detergente, de modo que a una concentración de SDS de 6,9 mM en el gra-diente, ligeramente superior a la c.m.c. de SDS en nuestro tampón, la segregación de lípidos alcanza el 80% siendo prácticamente total a 34,6 mM, concentración a la que las micelas proteína-SDS exentas de lípido, por su mayor densidad, están perfectamente separadas en el gradiente.

Por centrifugación diferencial a 160.000 xg. durante 90 min., ya sabíamos que el material solubili-zado tenía un tamaño mucho más pequeño que el de la membrana original, pero fue por sedimentación analítica (3.4) como supimos que en 1% de SDS la especie solubi-lizada es el monómero de proteína, y por tanto que la rotura había alcanzado a las interacciones proteína-proteína, mientras que a 0,1% de SDS, todavía hay una mezcla de monómero y dímero de proteína.

En cuanto a los otros detergentes empleados, es decir DchNa y Triton X100, sólo podemos señalar su menor efectividad respecto al SDS en cuanto a solubilización - total de MP se refiere. Teniendo en cuenta lo que sucede con bromuro de dodeciltrimetilamonio (9) y óxido de dimetildodecilamina (10) la acción de dichos detergentes sobre MP, debería estudiarse empleando condiciones y criterios distintos a los utilizados en este trabajo.

Por último, sólo nos quedan por discutir los resultados microcalorimétricos que están resumidos en la tabla V. Las entalpías máximas de interacción de liposomas de lípidos de MP con SDS son relativamente pequeñas, de lo que deducimos que su contribución a la entalpía de solubilización de la unidad elemental de membrana púrpura, esto es, (BR-lípido₅), va a ser pequeña. Por el contrario, la entalpía de interacción de BR libre de lípidos en agua con SDS es de 244 Kcal/mol de proteína, más del doble de la correspondiente para (BR-lípido₅), en MP.

Por estudios de sedimentación y difusión (3.4.) sabemos que BR libre de lípidos en agua está formando agregados cuyo número de agregación es dependiente del tiempo, y alcanza valores de 10 a 12 monómeros, tras tres semanas de diálisis. No sabemos por el momento que interacciones mantienen fundamentalmente a los monómeros en el agregado, si bien parece muy razonable pensar que sean hidrofóbicas, ni sabemos el valor energético de las mismas.

Un conocimiento de la energía de estabilización del agregado en agua por molécula del monómero, nos permitiría estimar la energía de interacción BR-BR en la membrana púrpura, a partir de la entalpía de solubilización de MP una vez deducida la contribución de los lípidos. Así, si consideramos una energía de estabilización del agregado en agua de 30 Kcal/mol de monómero, (la entalpía de polimerización de flagelina es de -34 Kcal/mol (11)), obtendríamos una energía de estabilización de la estructura cristalina de MP superior a las 100 Kcal/mol de BR, ya que la contribución de la interacción lípido de MP-BR tiene que ser muy pequeña comparada con la contribución de la interacción - BR-BR.

3.3. TOPOGRAFIA DE BR EN MP: DIGESTION DE CELULAS COMPLETAS DE H.H., MP Y BR EN AGUA CON ENZIMAS PROTEOLITICOS.

Con objeto de conocer la topografía de BR en MP y hacer un estudio comparativo con el efecto que las proteasas tienen sobre rodopsina en membranas de segmento externo de bastones de mamíferos (12) (13) (14) (15), se estudiaron los productos de hidrólisis de MP con papaína, quimotripsina, termolisina, reptilasa, trombina, tripsina y plasmina. Los productos de digestión insolubles se caracterizaron fundamentalmente mediante electroforesis en gel en SDS y los productos solubles por medio de mapas peptídicos.

En las condiciones iniciales empleadas, 37°C., relación enzima/proteína 1/20 (P/P), y 30 min. de hidrólisis, sólo papaína, quimotripsina y reptilasa hidrolizaban MP, obteniéndose en el caso de papaína un único producto particulado y final de hidrólisis.

Se volvió a repetir la digestión con quimotripsina y reptilasa a una relación 1/10 (P/P) y tiempos mayores, 60 y 120 min., no consiguiendo en ningún caso la hidrólisis total. Desde el punto de vista de movilidad electroforética relativa de los productos insolubles, ambos enzimas actuaban de forma idéntica, y sólo se continuó el estudio de la acción de la quimotripsina.

Elevando la temperatura a 45°C. (16), y empleando una relación enzima/proteína 1/10 (P/P), con un tiempo de incubación de 30 min., MP se hidrolizó totalmente con termolisina.

3.3.1. Proteolisis de MP.

La figura 16 muestra el curso cinético de la hidrólisis de MP con papaina, a una concentración de 1 mg. de proteína/ml. mediante caracterización electroforética de los productos de digestión insolubles. Al cabo de 15 min. la hidrólisis es total y ésta transcurre a través de un producto intermedio que rápidamente desaparece.

La masa molecular relativa del producto particulado final de hidrólisis fue 16.500 ± 500 , lo cual implica una hidrólisis aparente del 12% de la cadena polipeptídica si la comparamos con 18.700 ± 300 , masa molecular relativa de BR obtenida por el mismo procedimiento - (3.1.1.). La masa molecular obtenida para el producto de hidrólisis intermedio fue 17.500 ± 500 .

Con objeto de hacer un estudio hidrodinámico - del producto final de hidrólisis por centrifugación analítica, 22 mg. de MP se digirieron totalmente con papaina y de estas membranas una pequeña parte se disolvió en 1% de SDS, y el resto se delipidó con disolventes orgánicos. El residuo insoluble tras la extracción, se disolvió en 1% de SDS dializándose una parte frente a dicho -

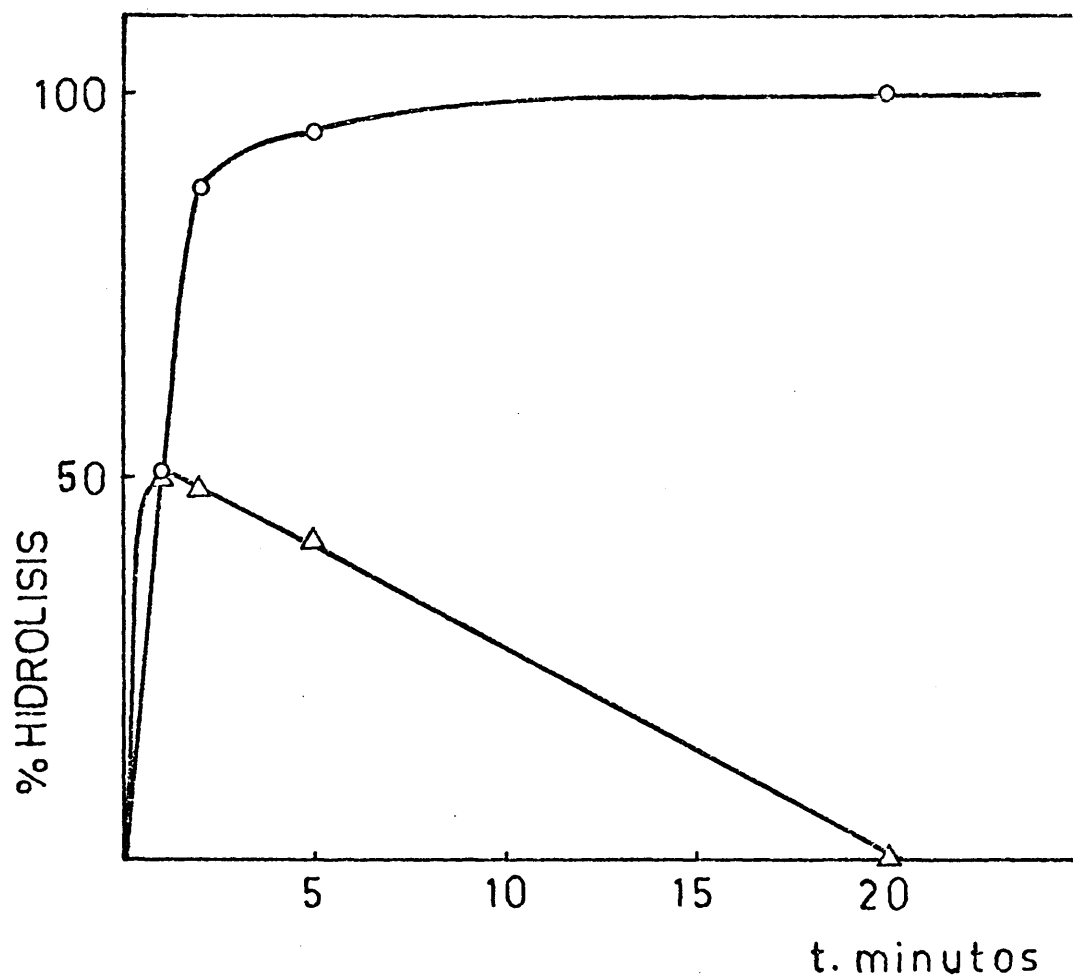


Figura 16.- Cinética de hidrólisis de MP con papaina. Producto intermedio (-△-). Hidrólisis total (-O-). (Condiciones - incubación ver texto 3.3.1.).

medio y el resto frente a agua destilada durante 21 días. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla VII comparados con los obtenidos en idénticas condiciones con MP íntegras.

TABLA VII

Sistema solvente	1% de SDS	1% de SDS	H ₂ O
Sistema óptico	Schlieren	Absorción a 280 nm	Schlieren
MP	1,0	4,4	-
MPH	0,9	2,5	-
BR	1,0	2,1	8,3
BRH	0,9	1,7	9,7

La figura 17 muestra la cinética de hidrólisis de MP con quimotripsina a una relación enzima/proteína 1/10 - (P/P) y concentración de proteína 1 mg./ml. De forma análoga a como ocurre con papaína, la reacción tiene lugar a través de un producto intermedio de masa molecular relativa - 16.000 ± 300 llegando a un producto final de 14.000 ± 300 , hidrolizándose por tanto aparentemente un 25% de la cadena polipeptídica.

En la figura 18 aparecen los perfiles electroforéticos correspondientes a distintos tiempos de hidrólisis de MP con quimotripsina. En ella puede verse como desaparece la banda correspondiente a MP original (banda a) su transformación en el producto intermedio (banda b) y la formación del producto final de hidrólisis (banda c).

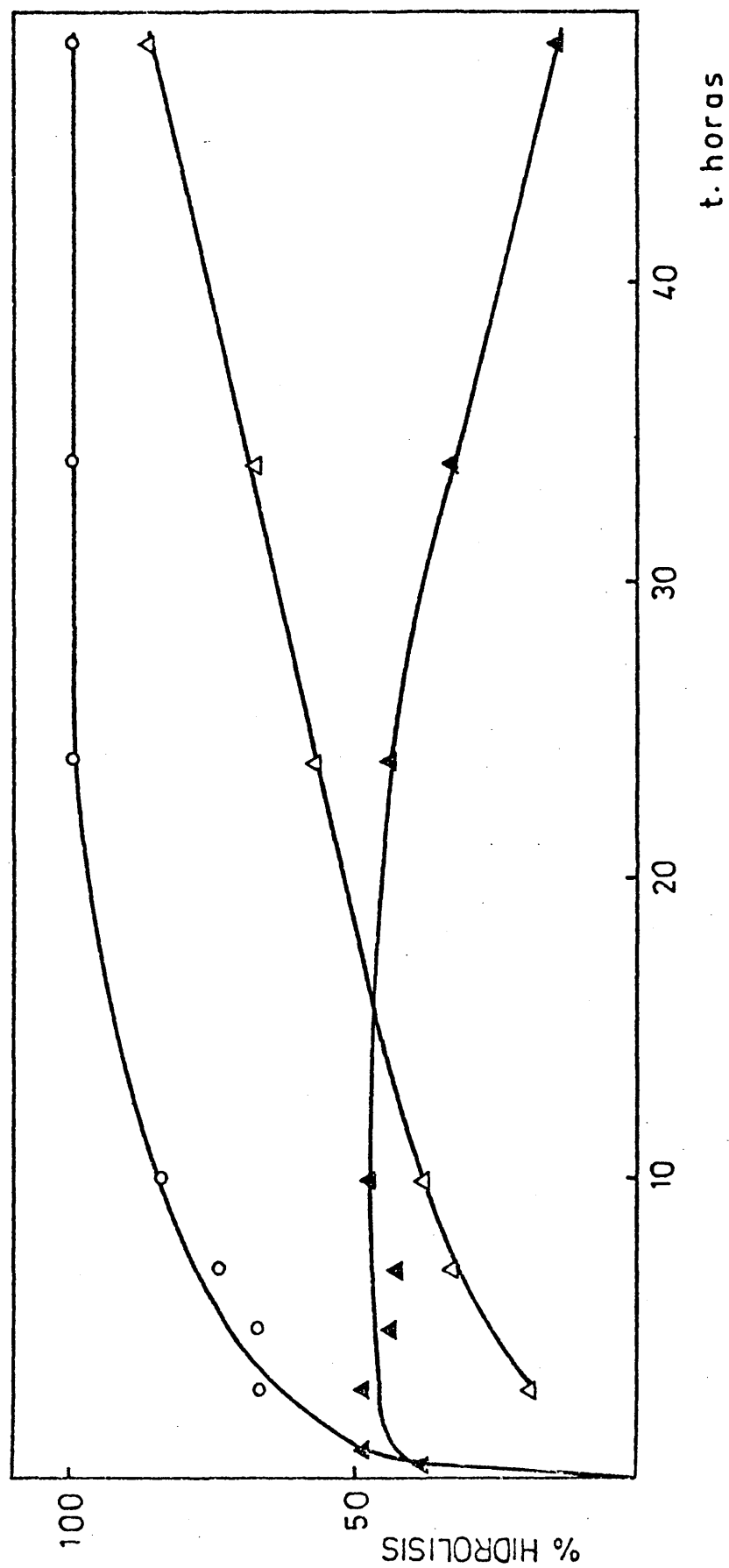


Figura 17.- Cinética de hidrólisis de MP con quimotripsina. Producto intermedio (\blacktriangle). Producto final (Δ). Hidrólisis total (\circ). (Condiciones incubación ver texto 3.3.1.).

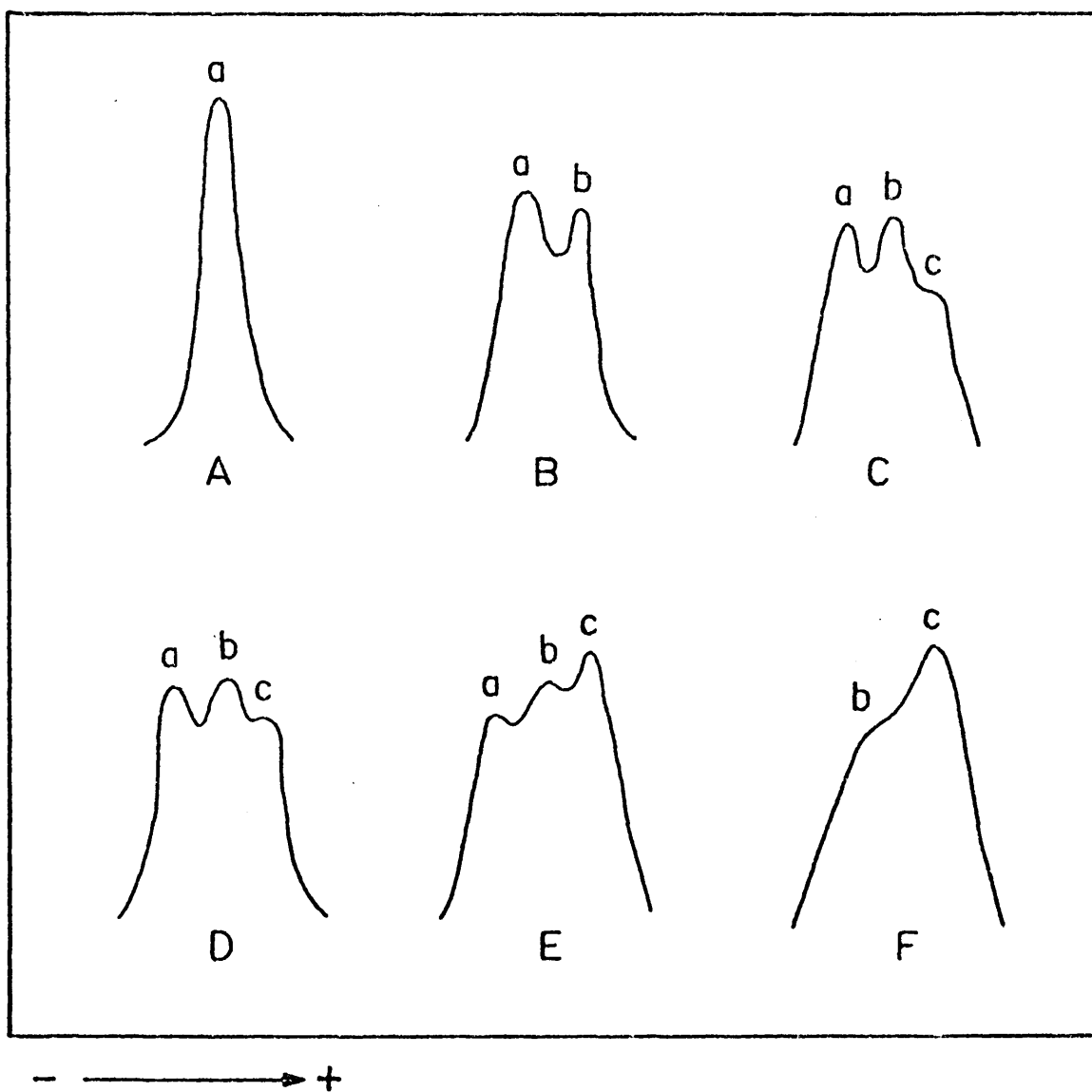


Figura 18.- Perfiles electroforéticos de los productos insolubles de hidrólisis de MP con quimotripsina tras distintos - tiempos de hidrólisis. A, control. B, 30 min. C, 3 h. D, 5 h. E, 7 h. F, 24 h.

En la tabla VIII aparecen recopiladas las masas moleculares relativas de los productos de hidrólisis de MP con papaína, quimotripsina y termolisina. X_1 , producto intermedio, X_2 , producto final.

TABLA VIII

MASA MOLECULAR RELATIVA DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTION DE MP

Proteasa	Producto hidrólisis	RF	Masa molecular	% hidrolizado
Control	MP	1	18.700 \pm 300	-
Papaína	X_1	1,02	17.500 \pm 500	6,4
	X_2	1,06	16.500 \pm 500	12
Quimotripsina	X_1	1,068	16.000 \pm 300	14
	X_2	1,137	14.000 \pm 300	25
Termolisina	X_2	1,069	16.000 \pm 500	14

Con objeto de saber si la porción hidrolizada con papaína y termolisina era la misma, se procedió a la proteólisis sucesiva de MP con ambos enzimas, obteniéndose indistintamente del orden empleado en las hidrólisis, productos finales únicos de masa molecular relativa 14.200 \pm 300, lo cual implica una digestión aparente de alrededor del 24% y pudiera indicar que cada enzima corta por extremos distintos de BR. La figura 19 muestra los perfiles electroforéticos de MP (A) y los productos finales de hidrólisis con papaína (B) termolisina (C) e hidrólisis sucesiva de ambas (D).

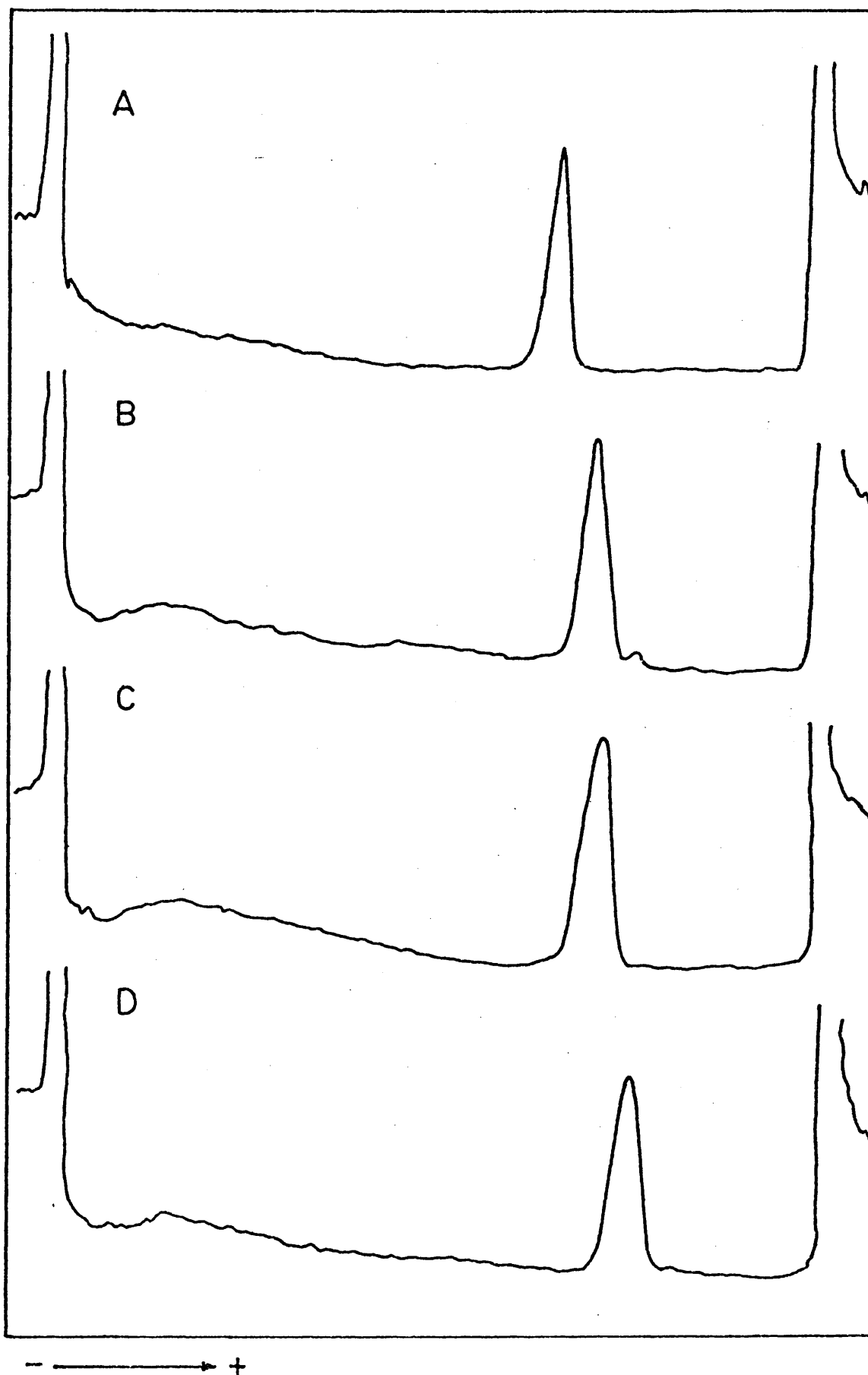


Figura 19.- Perfiles electroforéticos de MP (A), y de los productos insolubles de hidrólisis tras digestión con papaina (B), termolisina (C), e hidrólisis sucesiva con ambos enzimas.

Al pellet residual, producto de hidrólisis de MP con cualquiera de los enzimas estudiados, tras suspenderlo en agua se hicieron espectros de absorción y emisión, y de dicroísmo circular (DC), y se determinó la vida media del transiente que aparece a 412 nm (BR_{412}), encontrándose que no se veían afectados tras hidrolizar una parte de la cadena polipeptídica.

Vistos los productos insolubles de digestión, pasamos ahora al estudio de los productos solubles. Por un lado estudiamos el número de péptidos solubles generados por cada enzima al actuar sobre MP, así como su posición relativa en los mapas peptídicos, comparando número y posición para los distintos enzimas, así como con el mapa peptídico obtenido de la digestión de BR en agua por papaína.

Tras conocer la cantidad total de proteína hidrolicada con los distintos enzimas estudiados, se procedió a digerir una cantidad de MP tal que, el producto soluble de hidrólisis contuviese entre 1 y 1,5 mg/ml. de péptidos, que dividimos en tres fracciones, una de ellas para hacer una cromatografía descendente en papel, y las otras dos para un análisis bidimensional de cromatografía y electroforesis de alto voltaje. En cada experimento se utilizó aproximadamente un mg. de material soluble hidrolizado. Se hicieron los controles adecuados de corridas en blanco, y con los enzimas tratados en con

diciones idénticas que los péptidos a estudiar.

Las figuras 20, 21, 22 y 23, muestran los cromatogramas y mapas peptídicos correspondientes a la hidrólisis de BR en agua con papaína, MP con papaína, MP con termolisina en un pellet hidrolizado previamente con papaína, y por último hidrólisis de MP con quimotripsina.

En el mapa peptídico correspondiente a la hidrólisis de BR en agua con papaína (figura 20) se pueden distinguir más o menos bien delimitadas tres zonas de distribución de péptidos. Un grupo 1, que comprende aquellos péptidos cuyo RF en la primera dimensión y movilidad electroforética en la segunda - son más pequeños; un grupo 2, comprendiendo aquellos péptidos que avanzan más en la cromatografía y presentan una movilidad electroforética media; y un grupo 3, con un RF intermedio y la mayor movilidad electroforética. El péptido F, enmarcado con línea punteada, presenta fluorescencia, y tal vez corresponde al péptido que lleva unido el retinal.

En la figura 21, aparecen péptidos en la zona 1 con una distribución muy similar a los de BR en agua, y también uno en la zona 2. En la figura 22 también aparecen péptidos en ambas zonas. Por último la figura 23, muestra péptidos con una distribución en cierto modo intermedia entre las dos anterio

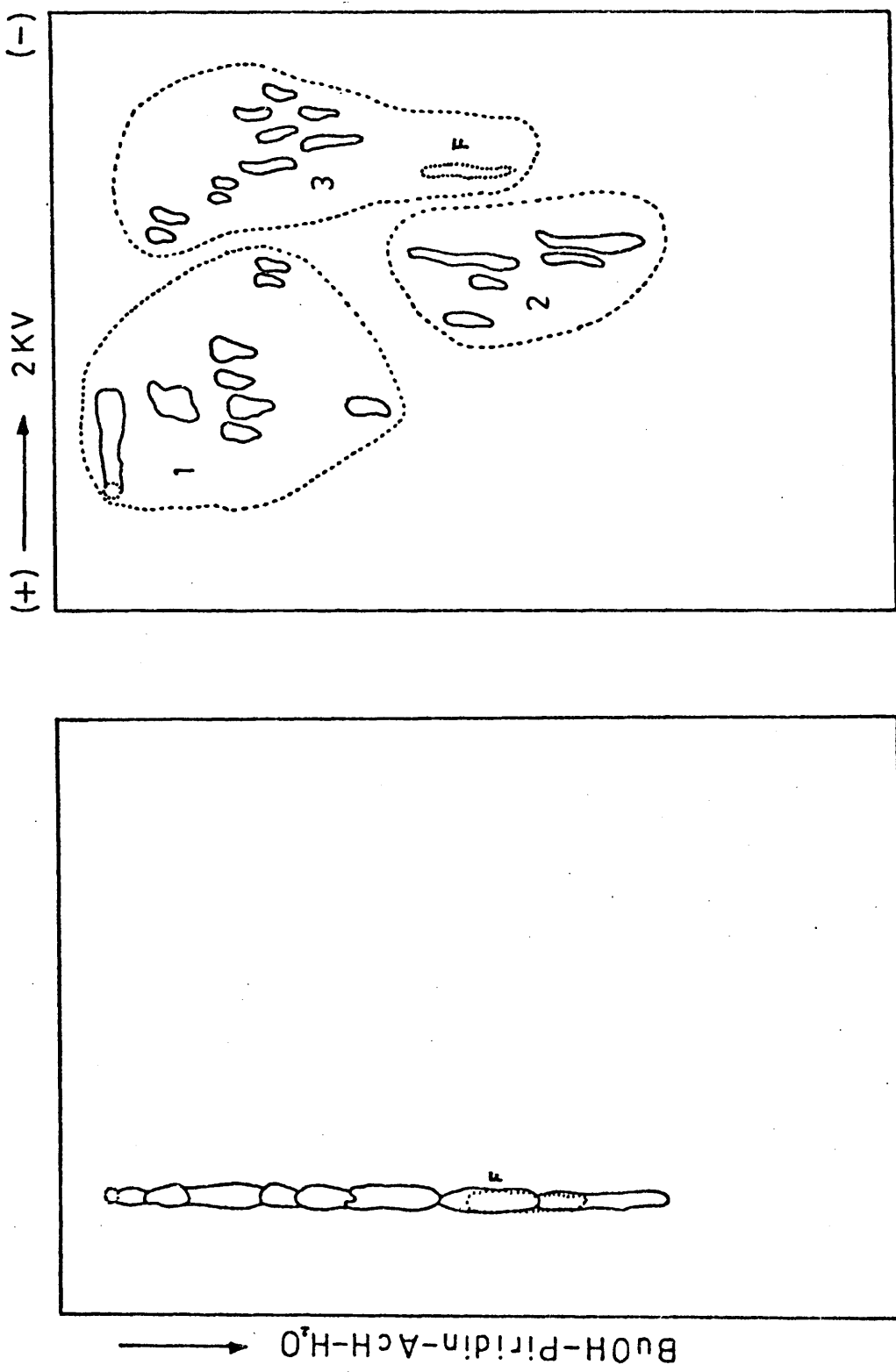


Figura 20.- Análisis bidimensional de los péptidos solubles productos de hidrólisis de BR en agua con papaina.

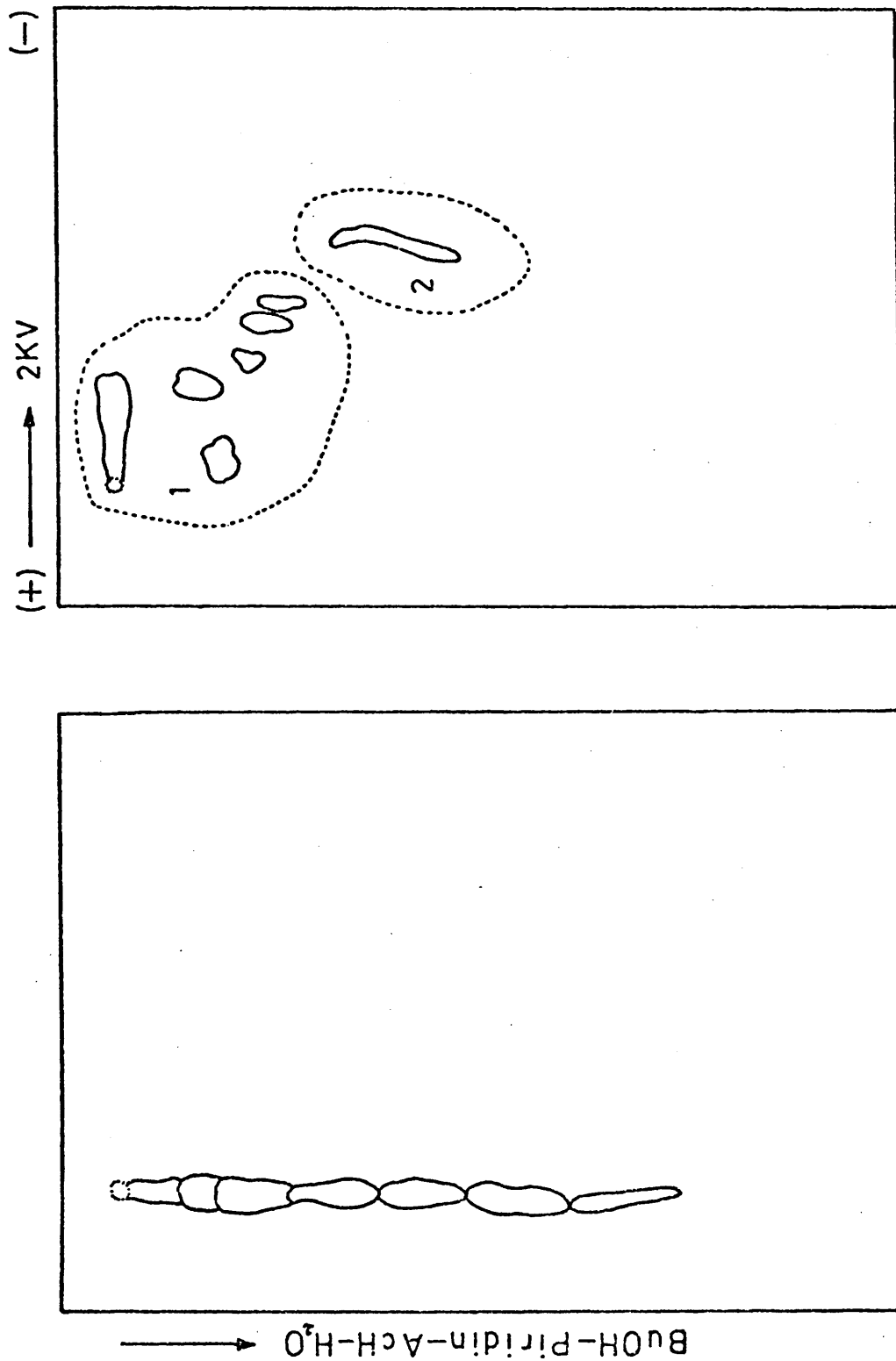


Figura 21.- Análisis bidimensional de los péptidos solubles productos de hidrólisis de MP con papaina.

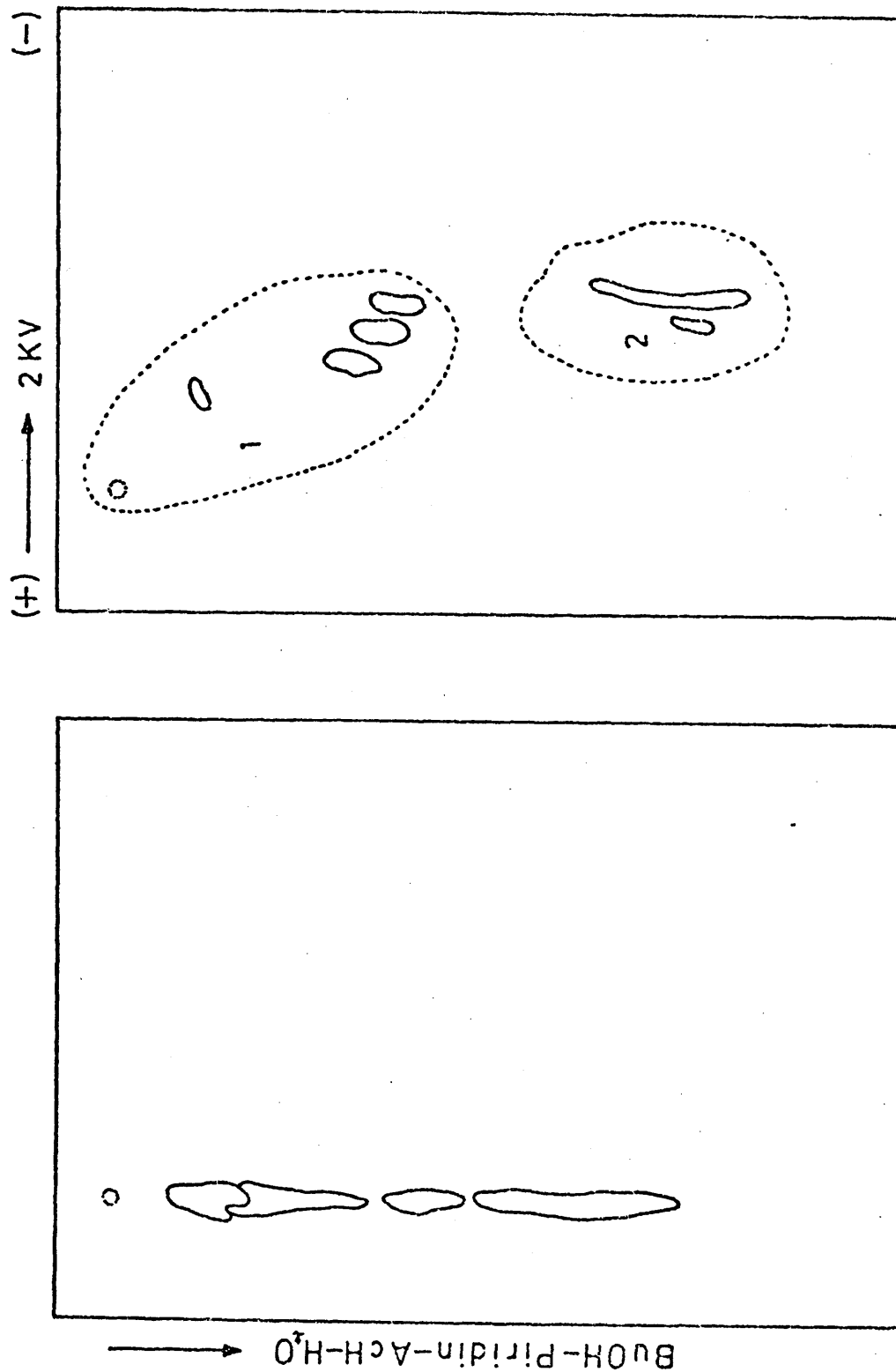


Figura 22.-- Análisis bidimensional de los péptidos solubles productos de hidrólisis de MP con termolisina en un pellet hidrolizado previamente con papaina.

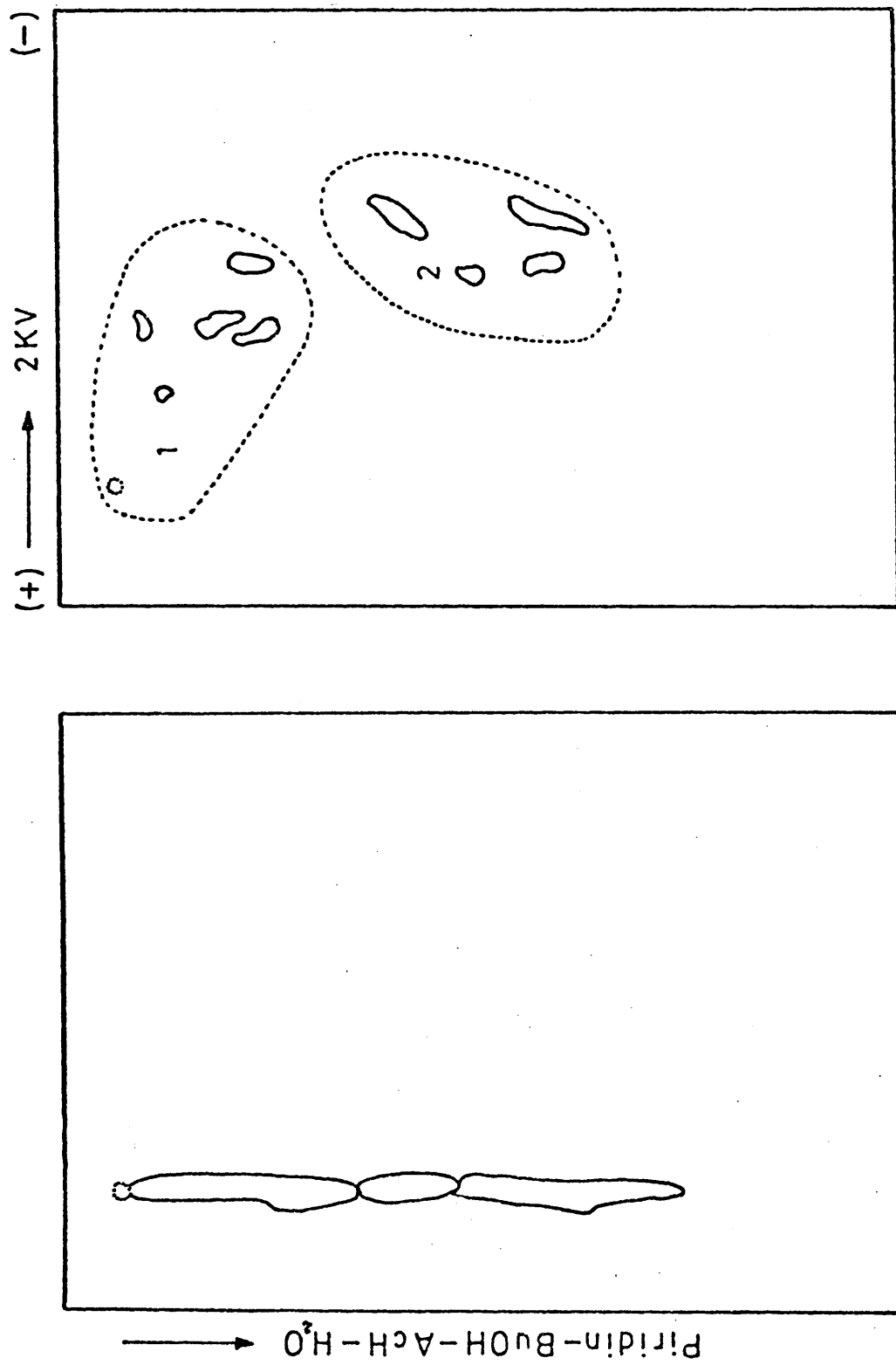


Figura 23.- Análisis bidimensional de los péptidos solubles productos de hidrólisis de MP con quimotripsina.

res. En ninguno de los casos los productos solubles de digestión contenían péptidos en la zona 3.

3.3.2. Proteolisis de MP fotolizadas con papaína

La fotólisis de MP en presencia de hidroxilamina, lleva consigo la rotura de la base de Schiff retinal-lisina con la consiguiente pérdida del color púrpura (máximo a 568 nm) (17). La figura 24, muestra el espectro de absorción de MP en tampón TRIS-ClH 0,1 M, cisteína 5 mM, EDTA, 2 mM, NH_2OH 0,2 M pH = 7,0 antes y después de ser fotolizadas durante dos horas, tiempo necesario para destruir el complejo, púrpura. MP en idéntico medio, salvo la ausencia de hidroxilamina y tratadas en condiciones idénticas, no muestran diferencia en el espectro de absorción correspondiente antes y después de fotolizadas.

Los perfiles electroforéticos correspondientes a la hidrólisis con papaína de MP fotolizadas, aparecen en la figura 25. El perfil (A) corresponde a los controles de MP, bien sin fotolizar o fotolizadas durante 2 h. El perfil (B) corresponde a MP fotolizadas en presencia de papaína, y posteriormente incubadas a 37° C. durante 30 min. Por último el perfil (C) nos muestra la acción de la papaína durante 30 min., sobre MP previamente fotolizadas en presencia de hidroxilamina.

La fotólisis, produce un cambio considerable en la estructura de BR, ya que hace que la papaína pase de cortar un 12% a un 24-28% de la masa molecular relada

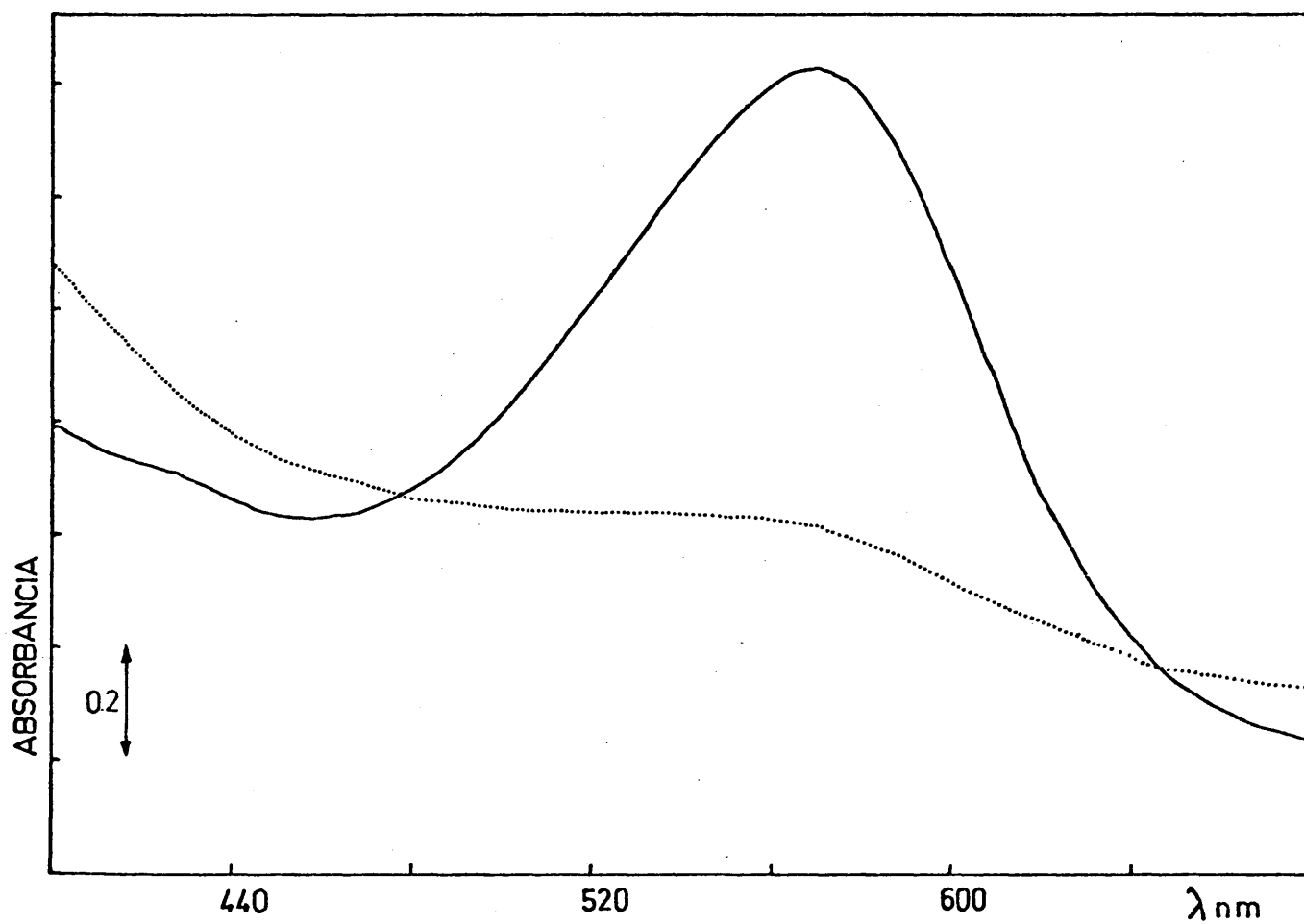
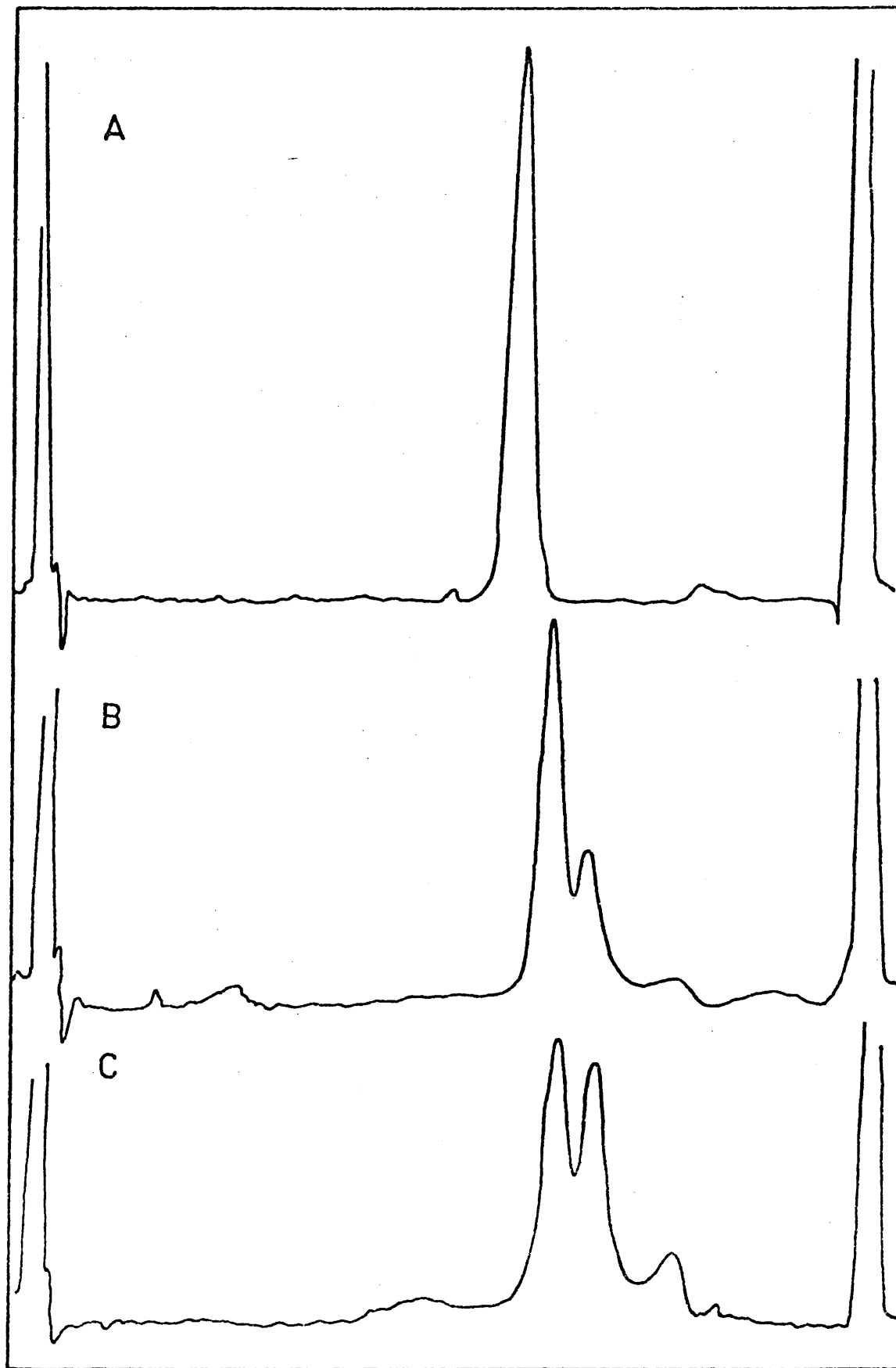


Figura 24.- Espectro de absorción de MP en tampón TRIS-ClH 0,1 M, cisteína 5 mM, EDTA 2 mM, NH_2OH 0,2 M, pH = 7. Sin fotolizar (—). Fotolizadas durante 2 h. (.....). (Condiciones de fotólisis ver texto 3.3.2.).



— — — — — → +

Figura 25.- Perfiles electroforéticos de MP fotolizadas. A, control. B, MP fotolizada en presencia de papaina e incubada posteriormente. C, MP fotolizada en presencia de hidroxilamina e incubada posteriormente con papaina.

tiva de BR.

La tabla IX recoge las masas moleculares relativas de los productos de hidrólisis de MP fotolizadas, con papaína.

TABLA IX

	RF	Masa molecular	%
Control MP	1	18.700	-
MP fotolizadas	1,065	16.200	13
en presencia de	1,132	14.200	24
papaína	1,288	12.400	34
MP fotolizadas	1,07	15.700	16
en presencia de	1,158	13.500	28
hidroxilamina	1,32	12.200	35

3.3.3. Proteolisis de H.H.

Para ampliar nuestra información sobre si los tres enzimas estudiados cortaban la cadena polipeptídica por el mismo o distintos extremos, y saber cual de ellos quedaba en la parte externa de la membrana, se procedió a hidrolizar MP en células completas.

Hay que señalar una vez más, que en este caso el medio contenía ClNa 4M, además de los activadores requeridos por cada enzima.

Los resultados relativos a la masa molecular de los productos de hidrólisis aparecen recopilados en la tabla X.

TABLA X

Proteasa	Tiempo	RF	Masa molecular	%
Control MP		1	18.700	-
Papaína	1 h.	1,002	18.800	-
		1,053	16.700	11
		1,083	15.700	16
Quimotripsina	18 h.	1,03	17.400	7
	24 h.	1,041	17.200	8
Termolisina	2 h.	1,041	17.200	8

3.3.4. Discusión

Tras la digestión de MP con papaína, termolisina y quimotripsina, el residuo insoluble, muestra un espectro de absorción en el visible y ultravioleta medio, y un espectro de emisión cuantitativa y cualitativamente iguales a los de la membrana antes de la digestión. El espectro de DC es cualitativamente igual al de MP intacta, y la vida media de la especie BR_{412} no se afecta tras la digestión. Esto nos demuestra que el cromóforo responsable del complejo púrpura, base de Schiff protonada, así como los aminoácidos aromáticos de la proteína permanecen intactos en este residuo insoluble no accesible a las proteasas, y nos permite suponer que muy posiblemente, conservando la misma disposición estructural que en la membrana intacta. Las medidas de dicroísmo lineal con resolución temporal de BR_{412} , igualmente muestran que en MP digeridas, BR

mantiene su estructura cristalina. Entre los motivos que justifican un acceso limitado de las proteasas, tenemos principalmente las interacciones BR-BR responsables de la red cristalina que forma BR en MP, y las interacciones BR-lípido.

Cuando esta estructura se destruye, por ejemplo en BR libre de lípidos en agua, la proteína se digiere totalmente en péptidos solubles como hemos visto en la figura 20. Al comparar este mapa peptídico con aquellos correspondientes a los productos solubles de digestión de MP con los tres enzimas mencionados anteriormente, observamos la presencia de un grupo nuevo de péptidos, que anteriormente identificamos como zona 3, y que relacionamos con la parte de BR en MP no accesible a las proteasas y entre los que se enouentra un péptido fluorescente, que llamamos F, posiblemente relacionado con el péptido al que está unido el retinal.

Otro aspecto importante de los estudios de digestión proteolítica, es identificar la región de la molécula de donde provienen los productos solubles de hidrólisis así como, en una proteína de membrana, si esta región está en el lado citoplasmático o extracelular de la membrana.

Antes de entrar en este aspecto, queremos recordar, que dado que el método de electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, empleado para la caracteriza-

ción de la masa molecular de los productos insolubles de digestión es tan deficiente (3.4.), estas masas moleculares son meramente provisionales, y por tanto los porcentajes de digestión deducidos de ellas, hasta que no se determinen con métodos más rigurosos. En esta discusión de proteólisis de MP, consideramos el peso molecular de BR obtenido por electroforesis de 18.700, a pesar de que por un método riguroso hemos determinado que es 34.000.

Primeramente tenemos que destacar, que los estudios de electroforesis de los productos insolubles están de acuerdo con los resultados espectroscópicos, esto es, que hay una región central mayoritaria de la proteína que es inaccesible a los enzimas, y que éstos, sólo afectan a una o a las dos regiones terminales de la proteína ya que el que más digiere, quimotripsina aparentemente sólo alcanza el 25% de la proteína. Papaína corta un 12% y termolisina un 14%. En los experimentos de digestión sucesiva de MP con ambos enzimas, independientemente de la secuencia de digestión, se digiere - un 24%, lo que pudiera interpretarse como que papaína ataca principalmente en un extremo terminal y termolisina en el otro.

También en membranas de segmento externo (14), sucede que la fracción de rodopsina hidrolizada por quimotripsina, es aproximadamente el doble de la digerida por papaína, habiéndose también encontrado en ambos ca

so un producto intermedio insoluble de hidrólisis, equivalente al que nosotros llamamos X_1 (tabla VIII).

Las significativas diferencias en los mapas peptídicos de los productos solubles de digestión con los tres enzimas, se puede interpretar como una evidencia más de que las regiones terminales de la proteína a las que tienen acceso, son distintas para cada una de ellos. Los productos solubles de digestión con papaína, corresponden fundamentalmente a los péptidos de la zona 1 del mapa peptídico de BR libre de lípidos en agua, mientras que los de termolisina están en el límite entre la zona 1 y 2 y en la zona 2, y los de quimotripsina están distribuidos igualmente entre las zonas 1 y 2.

Hasta ahora, hemos visto que las partes de BR en MP atacadas por las proteasas son las terminales, y solamente alguna evidencia indirecta de que la papaína y termolisina pueden cortar por extremos distintos.

Los resultados de los experimentos de digestión en células completas, resumidos en la tabla X, son concluyentes en cuanto a demostrar que papaína digiere fundamentalmente el extremo terminal extracelular, ya que en estas circunstancias, en las que suponemos no tiene acceso al interior citoplasmático, corta hasta un 16% del total de BR. Estos resultados no son tan concluyentes en cuanto a la polaridad de las regiones atacadas por termolisina y quimotripsina, ya que por un lado estos

enzimas cortan hasta un 8%, por tanto afectan a la región extracelular de BR en MP, pero no sabemos, si esta limitación con respecto a lo que cortan en MP aisladas es debida a la pared celular existente, o a la alta fuerza iónica en el medio, o a los mismos impedimentos que encuentran en MP aislada. Si es este último el caso, que es lo más razonable, entonces, podemos concluir que ambos enzimas cortan por los dos extremos, si bien quimotripsina afecta principalmente el extremo citoplasmático.

Nos queda ahora por discutir, el efecto de la fotólisis sobre la accesibilidad de los enzimas proteolíticos a BR en MP. Si durante el proceso de fotólisis hay una proteasa en el medio, en nuestro caso papaína - el porcentaje de digestión aumenta del 12% al 34 % sin destruir el complejo púrpura lo que nos indica, que el enzima tiene un mayor acceso a la proteína y además sigue respetando su cuerpo central. Por otro lado, si durante la fotólisis de MP hay hidroxilamina en el medio, y se destruye la base de Schiff, la digestión con papaína de estas membranas, también muestra que el enzima tiene un acceso mucho mayor a la proteína hidrolizando hasta un 35%.

Estos dos tipos de experimentos, nos permiten concluir que durante la fotólisis hay un gran cambio en la estructura de BR en MP, que al igual que permite el acceso de hidroxilamina hasta la base de Schiff, permite un mayor ataque con papaína.

3.4. COMPORTAMIENTO HIDRODINAMICO Y PESO MOLECULAR DE BR EN SOLUCIONES ACUOSAS CON DETERGENTE Y EN AGUA

3.4.1. Coeficientes de sedimentación de BR en 1% y 0,1% de SDS y en agua

1% de SDS.- En un principio, se utilizó sistema óptico schlieren apareciendo un pico asimétrico que - no llegó a desdoblarse, obteniéndose por tanto coeficientes de sedimentación medios de micelas de SDS y micelas BR-SDS. Estos coeficientes medios muy bajos $s_{25^{\circ}\text{C}}^{\circ} = 1\text{S}$ apenas varían con la concentración como puede verse en la figura 26 A y tienen un valor muy parecido al coeficiente de sedimentación de las micelas de SDS ($s_{25^{\circ}\text{C}}^{\circ} = 0,9\text{S}$). La figura 26 B muestra la similitud en los máximos de los gradientes de concentración schlieren para micelas de SDS sólo (pico de la izquierda) y para mezcla de micelas de SDS y SDS-proteína (pico de la derecha).

Empleando, absorción a 230 nm con detección - fotoeléctrica, las micelas de SDS absorben muy débilmente, por tanto se puede seguir la sedimentación de las - micelas BR-SDS separadamente.

Las muestras han de estar perfectamente equilibradas con el sistema solvente, lo cual exige largos períodos de diálisis (mínimo de tres semanas), y la temperatura a la cual se realiza este proceso influye nota

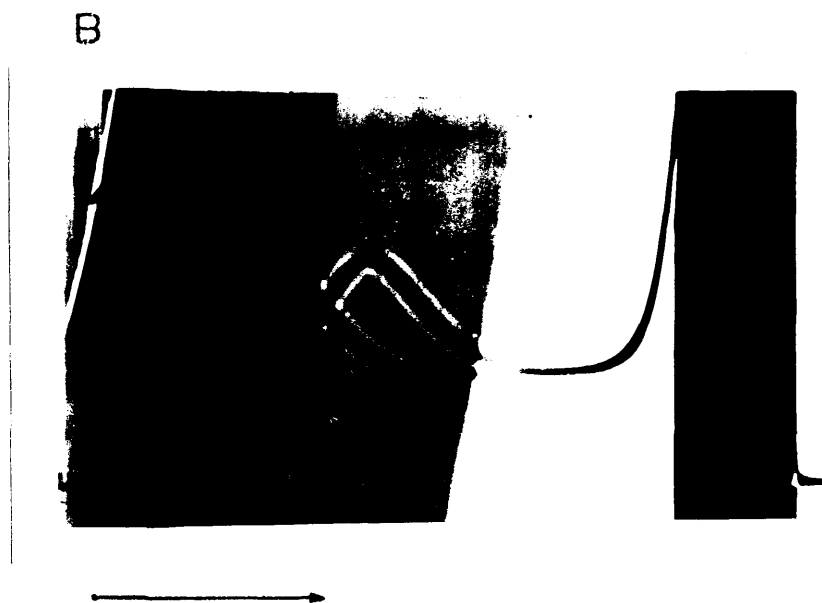
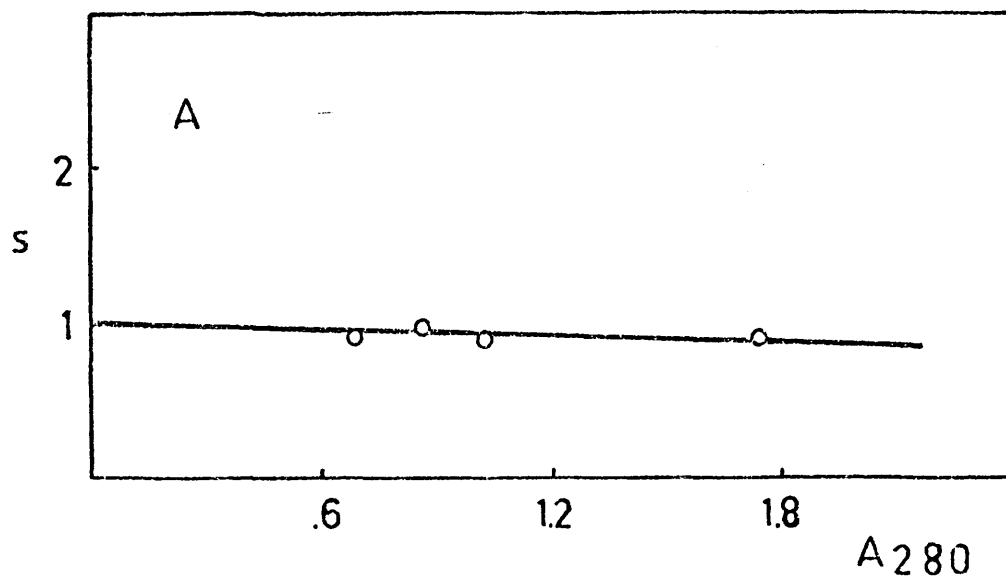


Figura 26.- A, coeficientes de sedimentación de BR en 1% de SDS, utilizando sistema óptico schlieren. B, sedimentación por schlieren de micelas de SDS (pico de la izquierda) y micelas SDS-BR (pico de la derecha). (→ dirección de sedimentación).

blemente en el valor de los coeficientes. La figura 27, refleja para una única muestra la influencia de la temperatura durante el período de diálisis, así como los valores obtenidos utilizando los distintos sistemas ópticos antes mencionados. En los trabajos posteriores dializamos las muestras a la misma temperatura que la seleccionada para los experimentos de ultracentrifugación.

La figura 28 A, muestra como la variación de los coeficientes de sedimentación con la concentración es prácticamente nula. Por mínimos cuadrados extrapolando a concentración cero, se obtiene un valor de $s_{25^{\circ}\text{C}}^{\circ} = 2,1 \pm 0,1\text{S}$.

0,1% de SDS.- Los experimentos se realizaron a 25°C . y por absorción a 280 nm. La figura 28 B, nos muestra que existe una mayor dependencia con la concentración que con 1% de SDS. En algunos casos se observaron indicios de agregación (éstos no se incluyen en la gráfica anterior ni en el cálculo del coeficiente). El valor final obtenido es de $s_{25^{\circ}\text{C}}^{\circ} = 2,4 \pm 0,1\text{S}$.

Agua.- Se comprobó que tras diálisis exhaustiva frente agua destilada, de las soluciones de BR en 1% de SDS, ésta permanece en solución en forma agregada y a 48.000 y 56.000 r.p.m. sedimenta como un pico asimétrico. En algunas ocasiones aparecieron otros picos secundarios, ahora bien el número de éstos, su intensidad e incluso el coeficiente de sedimentación medio no son

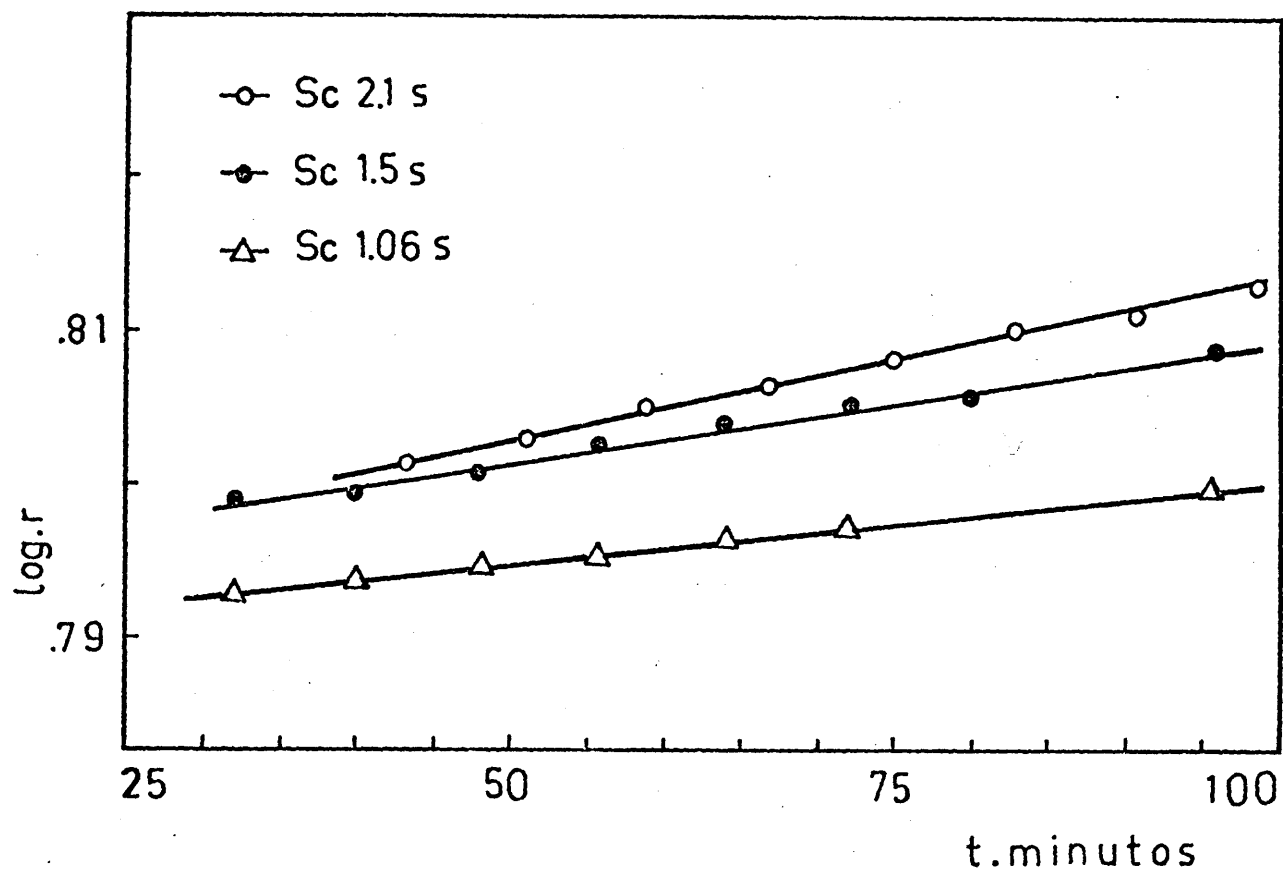


Figura 27.- Coeficientes de sedimentación de BR en 1% de SDS ($A_{280} = 1,5$). Temperatura de diálisis 25° C., absorción a 280 nm (○). Temperatura de diálisis 28° C., absorción a 280 nm (●). Sistema óptico schlieren (△).

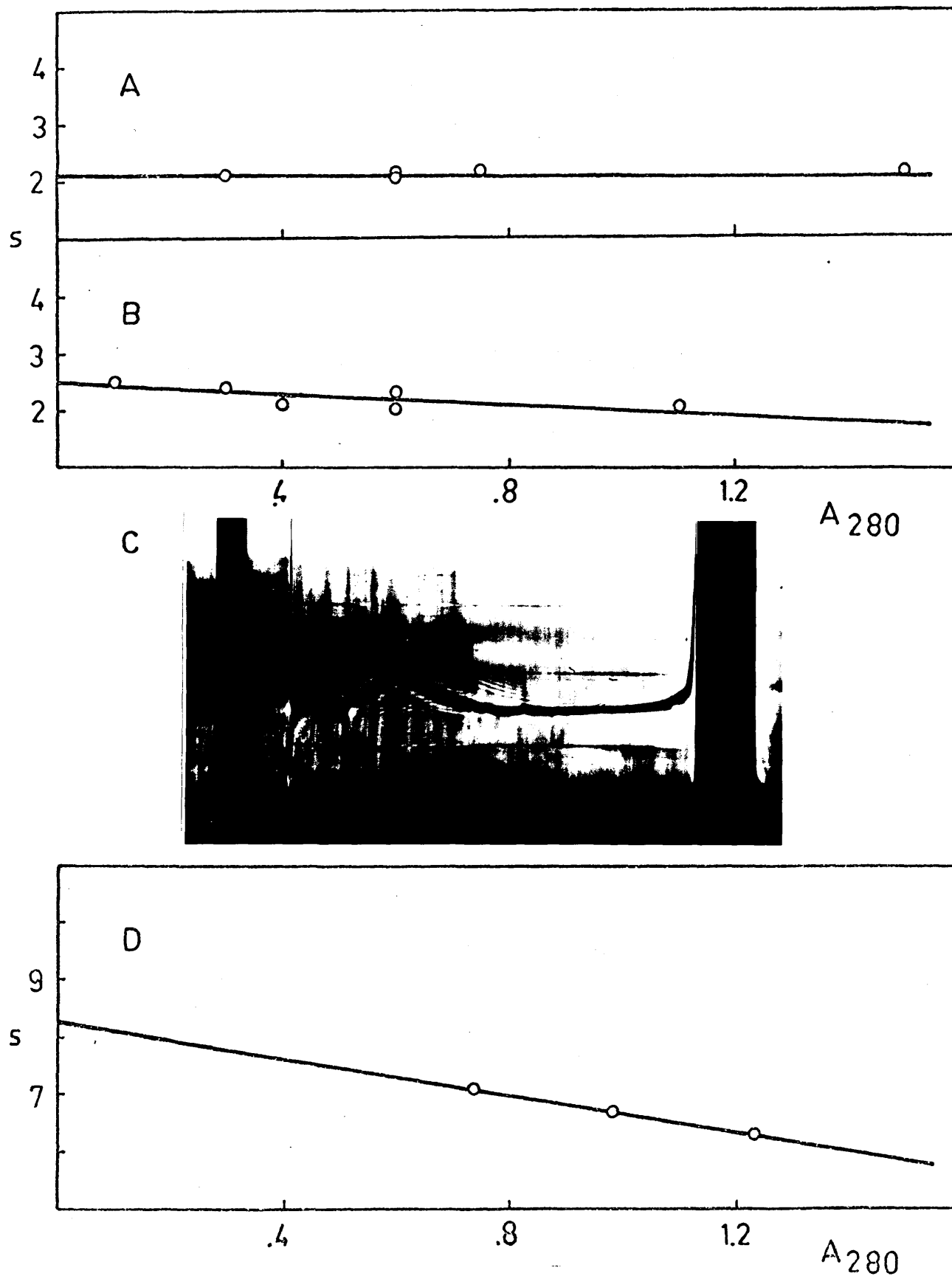


Figura 28.- A, coeficientes de sedimentación de BR en 1% de SDS. B, coeficientes de sedimentación de BR en 0,1% de SDS. C, sedimentación por Schlieren de BR en agua. D, coeficientes de sedimentación de BR en agua.

estables, lo cual parece indicar que se trata de un agregado (figura 28 C) cuyas características dependen de la preparación. Así en la figura 28 D, se muestra la linealidad existente entre los coeficientes de sedimentación - determinados en el mismo día para distintas diluciones de una muestra después de tres semanas de diálisis, para la que se obtuvo un s° de $8,3 \pm 0,1S$. Sin embargo, diez días más tarde el s° obtenido de estas mismas muestras era de $9,7 \pm 0,2S$ lo que pone de manifiesto el efecto del envejecimiento sobre el estado de agregación de BR en agua.

3.4.2. Coeficientes de difusión de BR en 1% y 0,1% de SDS y en agua

Los coeficientes de difusión aparentes se obtuvieron a partir de la ecuación:

$$D = \frac{A^2}{4\pi H^2 G^2 t} \quad (2)$$

Donde A, es el área en cm^2 interceptada por la curva schlieren y el eje de abscisas, y H es la altura máxima de la curva de campana en cm. Después de ampliar la placa fotográfica del registro gráfico, ambas medidas se obtuvieron con un planímetro ARISTO 1138L. G, es el factor de ampliación total de áreas y altura. En los experimentos realizados por nosotros, los tiempos de registros utilizados han estado comprendidos entre unos pocos centenares de seg. y 180.000 seg.

Las muestras conteniendo SDS se prepararon según las condiciones previamente establecidas, es decir, diálisis durante 21 días a temperatura igual a la de experimentación.

Los valores obtenidos en 1% de SDS se representan en la figura 29 de la que se deduce que el coeficiente de difusión de BR ~~en este~~ medio es independiente de la concentración, obteniéndose un $D_{1\% \text{ SDS}}^{\circ} = 0,66 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg.}^{-1}$.

En la misma figura vemos por el contrario la fuerte dependencia del coeficiente de difusión de BR en 0,1% SDS, para la que extrapolando a concentración cero se obtiene $D_{0,1\% \text{ SDS}}^{\circ} = 0,97 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg.}^{-1}$, que podría interpretarse como debida a cierto grado de agregación de la proteína a estas concentraciones bajas de SDS.

Por último la variación con el tiempo en la forma de los gradientes de concentración de BR en agua libre de detergente, demostró que se trataba de un agregado como ya hemos visto por sedimentación. A tiempos pequeños de difusión, los valores de los coeficientes determinados eran más altos (masas moleculares bajas) e imprecisos. A medida que el tiempo de difusión aumentaba, los valores eran más bajos (masas moleculares más altas), se estabilizaban y se hacían independientes de la concentración de proteína (figura 29), extrapolando a concentración cero a un valor $D_{\text{agua}}^{\circ} = 0,73 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg.}^{-1}$.

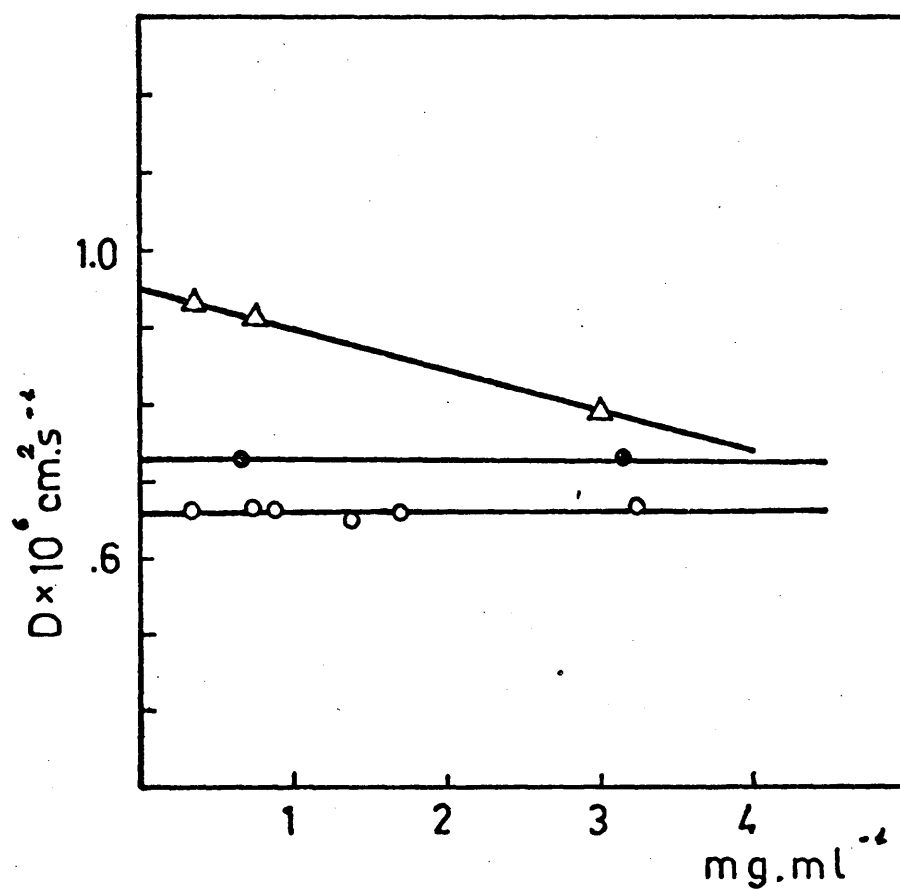


Figura 29.- Coeficientes de difusión de BR en 1% de SDS (\circ), 0,1% de SDS (\triangle), y en agua (\bullet).

3.4.3. Volumen específico parcial de BR en 1% de SDS y en agua

Las determinaciones de volumen específico en 1% de SDS, se hicieron siempre a partir de soluciones que se dializaron hasta equilibrio frente al sistema - solvente y que contenían una cantidad determinada de - peso seco en un volumen exactamente pesado. A partir - de esta pesada y la densidad se calculó la concentra- ción en gr/ml. de las muestras. Las figuras 30 A y 30B, muestran la dependencia lineal de la densidad frente a concentración. A partir de la pendiente de estas rectas aplicando la ecuación {9} (capítulo 2), calculamos el valor del volumen específico parcial, que en este caso no varía con la concentración (pendiente constante). Así se obtuvo un valor de 0,752 ml./gr. para ϕ_2' , con - una desviación en tres determinaciones de $\pm 0,001$ ml/ /gr.

Las determinaciones en agua, se hicieron em- pleando concentraciones previamente estandarizadas fren- te a absorbancias (3.1.5.), obteniéndose para \bar{v}_2 un va- lor de $0,815 \pm 0,001$ ml/gr. (dos determinaciones).

Como se vió en 2.3.8.3, Tanford y otros (18) relacionando ambos volúmenes específicos, ϕ_2' y \bar{v}_2 , cal- culan el valor de δD (gr. de detergente ligados por gr. de proteína), suponiendo que el volumen específico par- cial del detergente unido a la proteína debe ser muy -

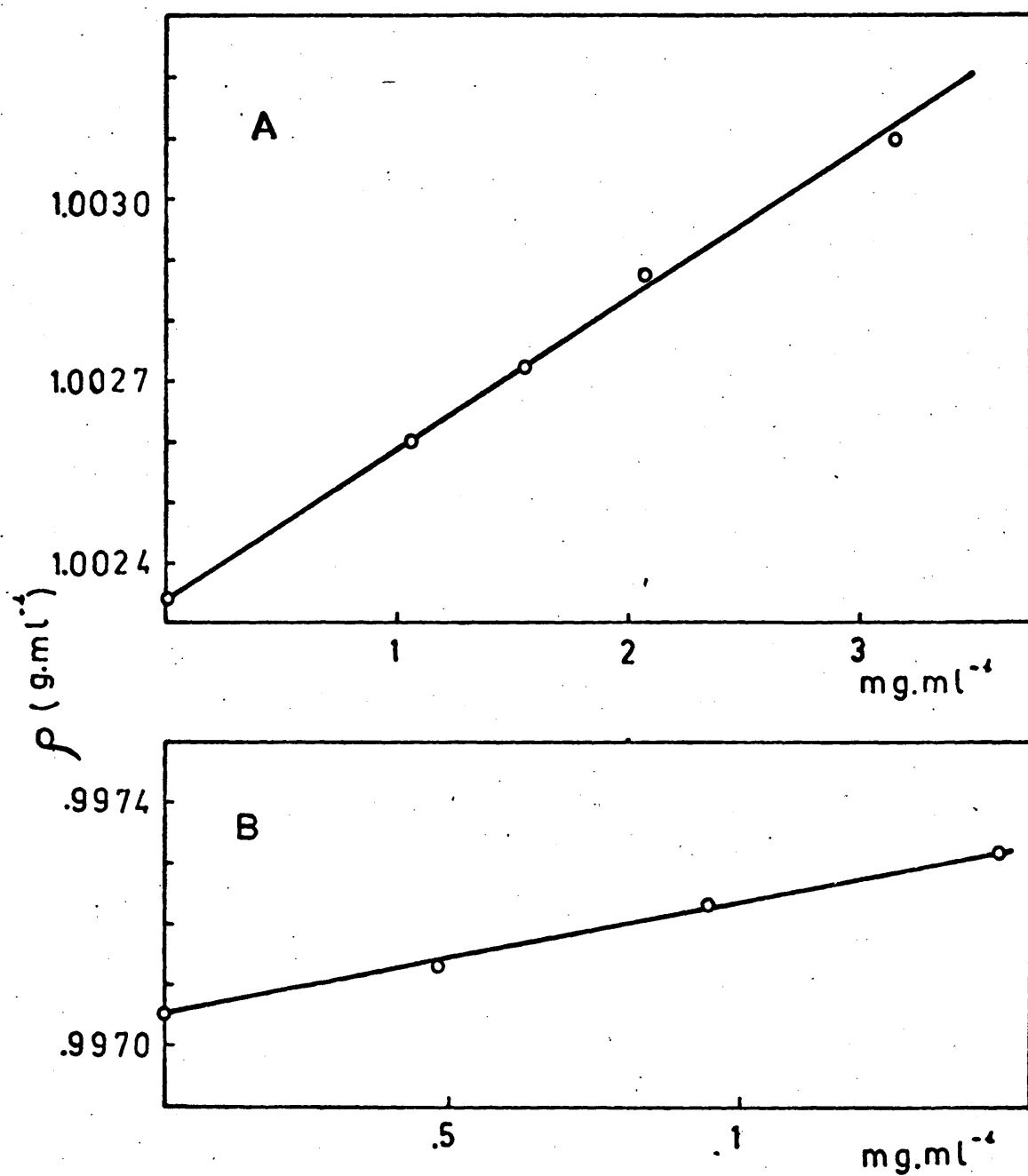


Figura 30.- Densidad frente a concentración. A, BR en 1% de SDS.
B, BR en agua.

parecido al valor de \bar{v}_D en la micela de detergente pura, $\bar{v}_D = 0,870$ ml/gr. (18). Aplicando la ecuación {14} (capítulo 2), despreciando el último término (contribución de otras sustancias distintas al detergente) y reagrupando términos nos queda:

$$\phi'_2 = \bar{v}_2 - \delta_D \left(\frac{1}{\rho_0} - \bar{v}_D \right) \quad (3)$$

donde ρ_0 , la densidad del disolvente (tampón TRIS-ClH 0,1 M, pH = 7,7, 1% de SDS) es igual a 1,00235 gr/ml.

Sustituyendo valores obtenemos un valor de $\delta_D = 0,49$ gr. de SDS por gr. de BR o 58 moles de SDS por mol de BR (peso molecular de BR utilizado 34.000).

El volumen específico parcial, \bar{v}^* , de la micela BR-SDS puede calcularse (18) a partir de la ecuación:

$$\bar{v}^* = \frac{\bar{v}_2 + \delta_D \bar{v}_D}{1 + \delta_D} \quad (4)$$

y sustituyendo valores se obtiene $\bar{v}^* = 0,833$ ml/gr.

3.4.4. Peso molecular de BR en 1% de SDS

3.4.4.1. Equilibrio de sedimentación

Al iniciar estos experimentos y hasta alcanzar las condiciones experimentales adecuadas se obtuvieron - una serie de valores de la masa molecular cuya dispersión nos llevó a dudar de su validez, y que ilustramos - brevemente a continuación.

El empleo de aceite para formar un fondo artificial en el canal de la disolución proteica y debido a su interacción con el detergente cambia las condiciones de equilibrio, obteniéndose valores de pesos moleculares muy bajos (19.000 y 22.700).

Si la solución proteica se dializa a temperaturas inferiores a las de experimentación, obtenemos valores altos de peso molecular (37.000). Además en este caso al centrifugar a alta velocidad para determinar la línea de cero, ésta queda por debajo del cero óptico (figura 31 A).

Por fin, empleando una óptica recién alineada, realizando el proceso de diálisis a la temperatura de experimentación, y enrasando los meniscos de disolvente y disolución, la línea base apareció a nivel del cero óptico, el blanco presentó una línea horizontal, obteniéndose así en distintos experimentos, equilibrios de sedimentación con registros superponibles, dando por tanto un único valor de peso molecular.

En la figura 31 B y 31 C se muestra la curva exponencial de concentración frente a r^2 y su correspondiente línea de base para uno de los experimentos válidos. Dichos perfiles corresponden a la solución de $A_{280} = 0,2$. La velocidad de régimen fue de 16.000 r.p.m. y la temperatura 23,4° C.

Según se vió en 2.3.8.3. la ecuación final para calcular el peso molecular de BR en 1% de SDS por equi

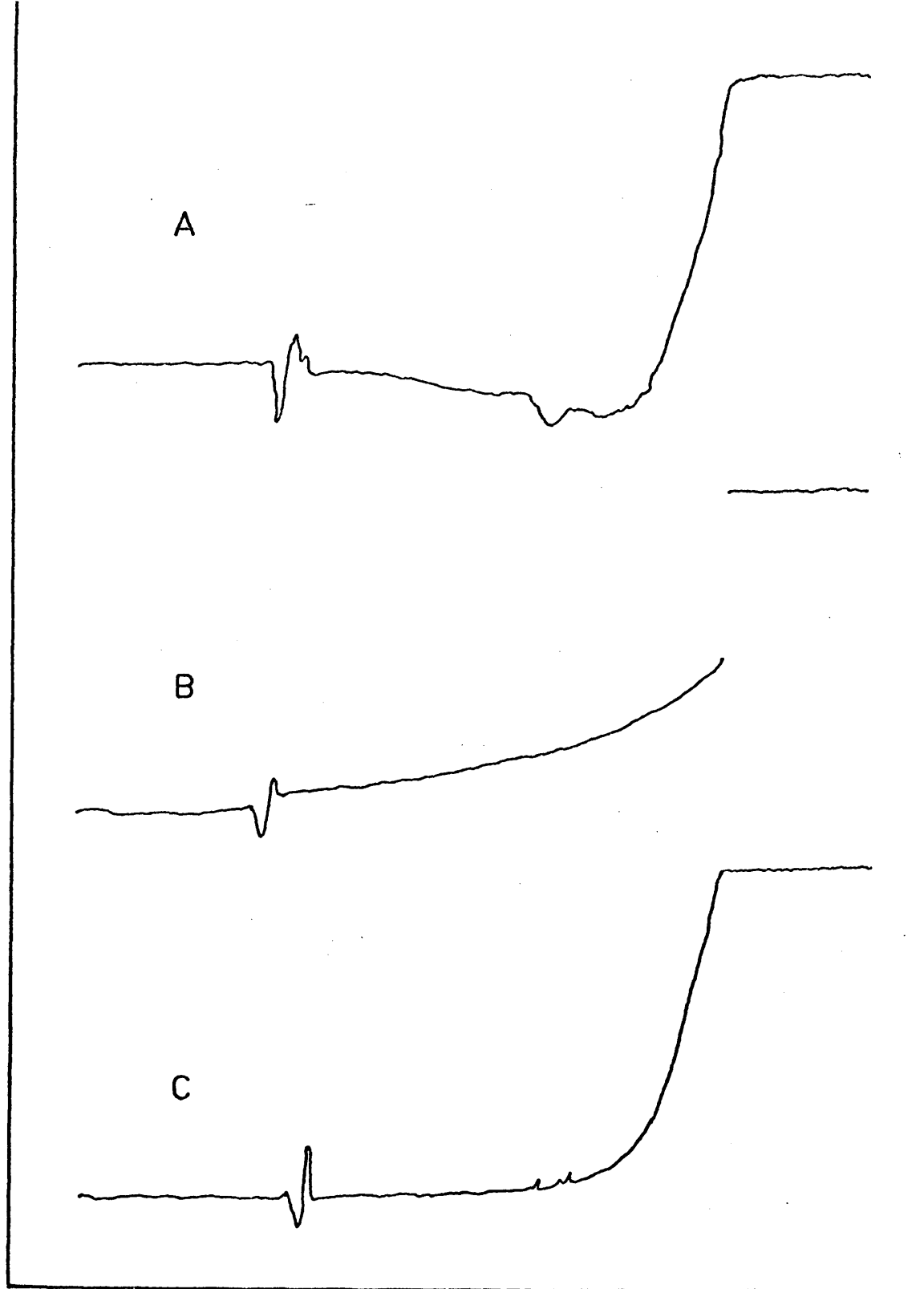


Figura 31.- A, línea de cero de una muestra dializada a temperatura inferior a la de experimentación. B, curva exponencial de concentración frente a r^2 y C, línea base para un experimento correcto ($A_{280} = 0,2$, 16.000 r.p.m., 23,4° C., 72 h.).

librio de sedimentación es:

$$\frac{d \ln C_2^*}{d r^2} = \frac{M_2 \omega^2 (1 - \phi_2' \rho_0)}{2 R T} \quad (5)$$

donde:

$T = 296,4^\circ \text{ K}$

K constante de los gases $= 8,313 \times 10^{-7} \text{ (erg.}^\circ\text{K}^{-1} \cdot \text{M}^{-1})$

ω^2 velocidad angular al cuadrado (rad/seg.) $= 2,807 \times 10^6$

$\phi_2' = 0,752 \text{ ml/gr.}$ y $\rho_0 = 1,00235 \text{ gr/ml}$ según se vió en (3.4.3.)

r , distancia al eje de rotación (en cm. reales).

C_2^* concentración (A_{280})

Por tanto: $M_2 = k \frac{d \log C_2^*}{d r^2}$

Donde $k = \frac{2 R T 2,303}{(1 - \phi_2' \rho_0) \omega^2} = 1,65 \times 10^5$ y $\frac{d \log C_2^*}{d r^2}$, es el

valor de la tangente obtenida representando A_{280} (absorbancias calculadas a partir de alturas de reflexión de pluma, transformadas a través de las curvas de calibración de cada uno de los registros), frente al cuadrado de las respectivas distancias al centro de giro en cm. reales.

La figura 32 muestra las representaciones de absorbancia frente a r^2 para cada una de las células de uno de los experimentos, ($A_{280} = 0,2, 0,3, 0,4, 0,5$) de cuyas tangentes, se obtuvieron las masas moleculares apa

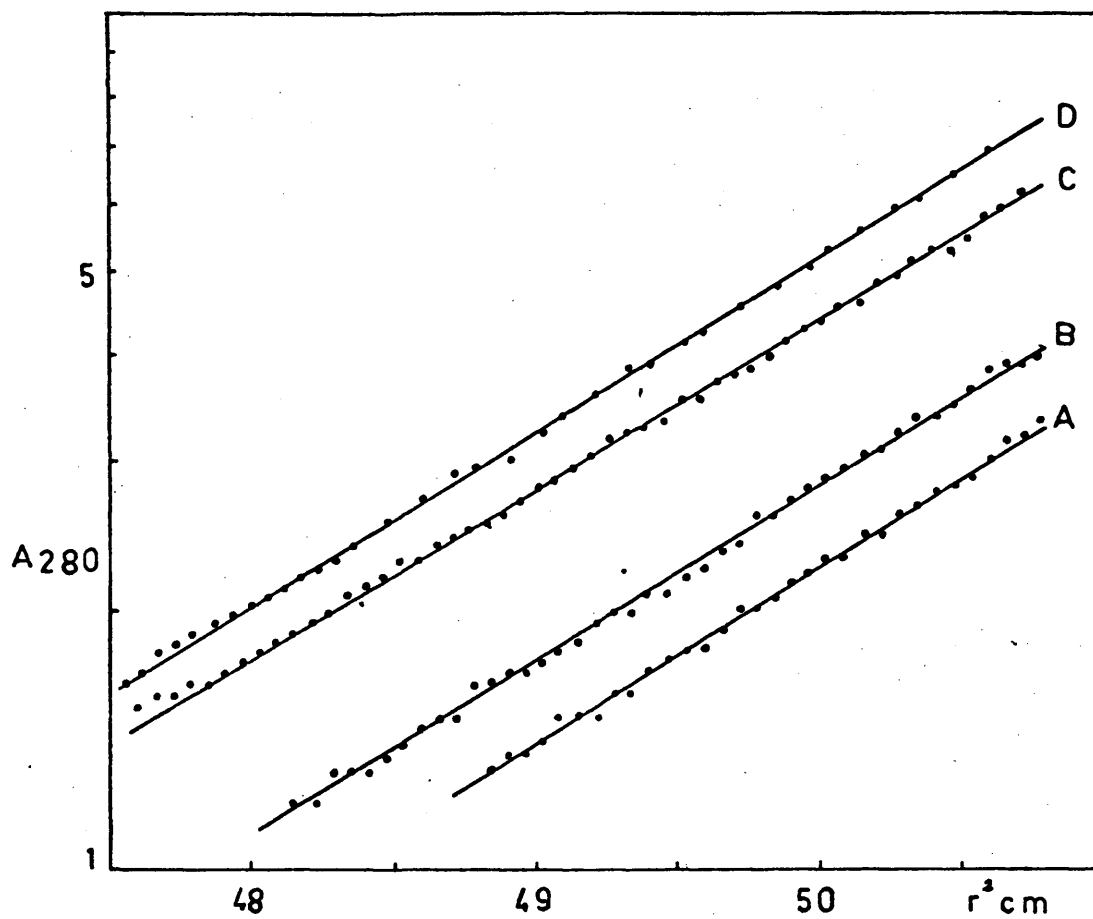


Figura 32.- Equilibrio de sedimentación de BR en 1% de SDS.
 (16.000 r.p.m., 23,4° C.). A, $A_{280} = 0,2$; B, 0,3;
 C, 0,4; D, 0,5.

rentes que aparecen resumidas en la Tabla XI

TABLA XI

Célula nº	A ₂₈₀	Tangentes	M _{2app}
1	0	-	-
2	0,2	0,205 ± 0,005	33.800 ± 800
3	0,3	0,2038 ± 0,003	33.600 ± 800
4	0,4	0,198 ± 0,002	32.700 ± 600
5	0,5	0,2046 ± 0,002	33.700 ± 400

Mediante un ajuste de mínimos cuadrados representando el inverso del peso molecular aparente frente A₂₈₀ con los datos de los experimentos realizados, dan un peso molecular para BR de 34.000 ± 900.

Una vez conocido que la proteína sin solvatar tiene un peso molecular de 34.000, y que $\delta_D = 0,49$, la masa molecular de la micela BR-SDS, vendrá dada por:

$$M_2^* = M_2 (1 + \delta_D) = 50.700.$$

3.4.4.2. Combinación de medidas hidrodinámicas

El coeficiente de sedimentación determinado por ultracentrifugación analítica en 1% de SDS, y extrapolando a concentración cero (s^0 en S) viene dado por la ecuación

$$s^{\circ} = \frac{M_2^* (1 - \bar{v}^* \rho_0)}{N f_s} \quad (6)$$

puesto que hidrodinámicamente, se trata de la partícula entera BR-SDS, donde N, es el número de Avogadro y f_s es el coeficiente de fricción de la partícula de masa molecular M_2^* determinado por sedimentación.

El coeficiente de difusión (D en $\text{cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$) se expresa según la ecuación:

$$D = \frac{RT}{N f_D} \left| 1 + C \left(\frac{\delta \ln \gamma}{\delta C} \right)_u \right| \quad (7)$$

siendo f_D el coeficiente de fricción determinado por difusión.

Si en una misma muestra determinamos ambos coeficientes s y D, los coeficientes de fricción relacionados con ambos parámetros, es decir f_s y f_D , deben ser iguales (19) al corresponder a una misma partícula. Por tanto, podemos despejar f entre ambas ecuaciones. Extrapolando a concentración cero separadamente s y D, y reagrupando términos nos queda :

$$M_2^* = \frac{s^{\circ} R T}{D^{\circ} (1 - \bar{v}^* \rho_0)} \quad (8)$$

Tanford y otros (18) (20), emplean esta ecuación para calcular el peso molecular de la proteína no solvatada M_2 , sustituyendo el volumen específico par-

cial de la micela BR-SDS, \bar{v}^* , por el volumen específico parcial efectivo ϕ_2' de la proteína. Para ello ha de cumplirse: a) que la solución más allá de la zona límite - tenga una concentración de proteína constante (zona plateau), b) el componente difusible (SDS en nuestro caso), esté en equilibrio a lo largo de la célula, c) los experimentos han de realizarse por encima de la c.m.c. Según esto, la ecuación anterior puede expresarse:

$$M_2 = \frac{s^{\circ} R T}{D (1 - \phi_2' \rho_0)} \quad (9)$$

Según hemos visto en 3.4.1. y 3.4.2. $s_{1\% \text{ SDS}}^{\circ} = 2,1 \pm 0,1 \text{ S}$, y $D_{1\% \text{ SDS}}^{\circ} = 0,66 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$. Los otros parámetros según se vió en 3.4.3. tienen los siguientes valores: $\phi_2' = 0,752 \text{ ml/gr.}$; $\bar{v}^* = 0,833 \text{ ml/gr.}$, y $\rho_0 = 1,00235 \text{ gr/ml}$. Sustituyendo en las ecuaciones (8) y (9) obtenemos para M_2 un peso molecular de 32.100 y para M_2^* 47.800, valores ambos ligeramente más bajos que los obtenidos por equilibrio de sedimentación. Estas diferencias se pueden explicar: En primer lugar porque se trata de un método de medida mucho menos preciso; y en - segundo lugar, aunque todas estas determinaciones se basan en masas moleculares promedio en peso, la relación s/D puede no dar exactamente el mismo promedio (19).

3.4.4.3. Dimensiones y forma de la partícula total

El radio mínimo (R_{\min}), es el valor del radio que tendría una esfera no solvatada con un volumen igual al de la partícula BR-SDS, (18) estando relacionados por la siguiente expresión:

$$V = \frac{4}{3} \pi R_{\min}^3 = \frac{M_2^* \bar{v}^*}{N} = \frac{M_2}{N} (\bar{v}_2 + \delta_D \bar{v}_D) \quad (10)$$

donde sustituyendo valores, se obtiene un $R_{\min} = 26 \text{ \AA}$.

El radio de Stokes (R_s), es el radio de la esfera equivalente, que tendría el mismo coeficiente de fricción que el que posee la partícula y viene dado según la ley de Stokes:

$$f = 6\pi\eta R_s \quad (11)$$

siendo η , la viscosidad del disolvente en poises = $9,636 \times 10^{-3}$, (valor del tampón con 1% de SDS determinado experimentalmente). A partir de la ecuación (6), podemos calcular $f = 0,66 \times 10^{-7}$, valor que sustituido en la ecuación de Stokes nos da un $R_s = 36 \text{ \AA}$.

El cociente R_s/R_{\min} proporciona una información aproximada sobre la forma y la solvatación de la partícula total. Calculando el coeficiente de fricción por medidas de sedimentación se obtiene un R_s/R_{\min} de 1,4. A partir de medidas de difusión la relación R_s/R_{\min} es de 1,35, valor prácticamente igual al obtenido por sedimentación, ya que una variación de 0,05 S, que está dentro del error experimental, nos daría la -

misma relación.

Al menos un 75% de todas las proteínas solubles en agua conocidas tienen una relación $R_s/R_{\min} < 1,25$, demostrando que deben ser globulares y relativamente poco solvatadas. Si suponemos una contribución razonable de la hidratación (21) 0,2 gr/gr. de proteína, una relación de R_s/R_{\min} de 1,4, indicaría un elipsoide prolato con una relación axial de 6-5 a 1.

3.4.5. Peso molecular de BR en SDS al 0,1%

3.4.5.1. Equilibrio de sedimentación

Realizado el equilibrio de sedimentación en las condiciones previamente establecidas para 1% de SDS, temperatura de diálisis igual a temperatura de experimentación 25° C. y células sin fondo de aceite, se obtuvieron a 20.000 r.p.m. los resultados reflejados en la figura 33. Esta representación de A_{280} frente a r^2 se puede ajustar a dos rectas de distinta pendiente A y B, indicando la existencia de al menos dos especies diferentes.

El equilibrio de sedimentación mide directamente el término definido termodinámicamente $M_2 (1-\phi_0)$, si conocemos la masa molecular de la proteína M_2 , podemos calcular el volumen específico parcial efectivo y por tanto la cantidad de detergente unida a la proteína (δ_D) (22).

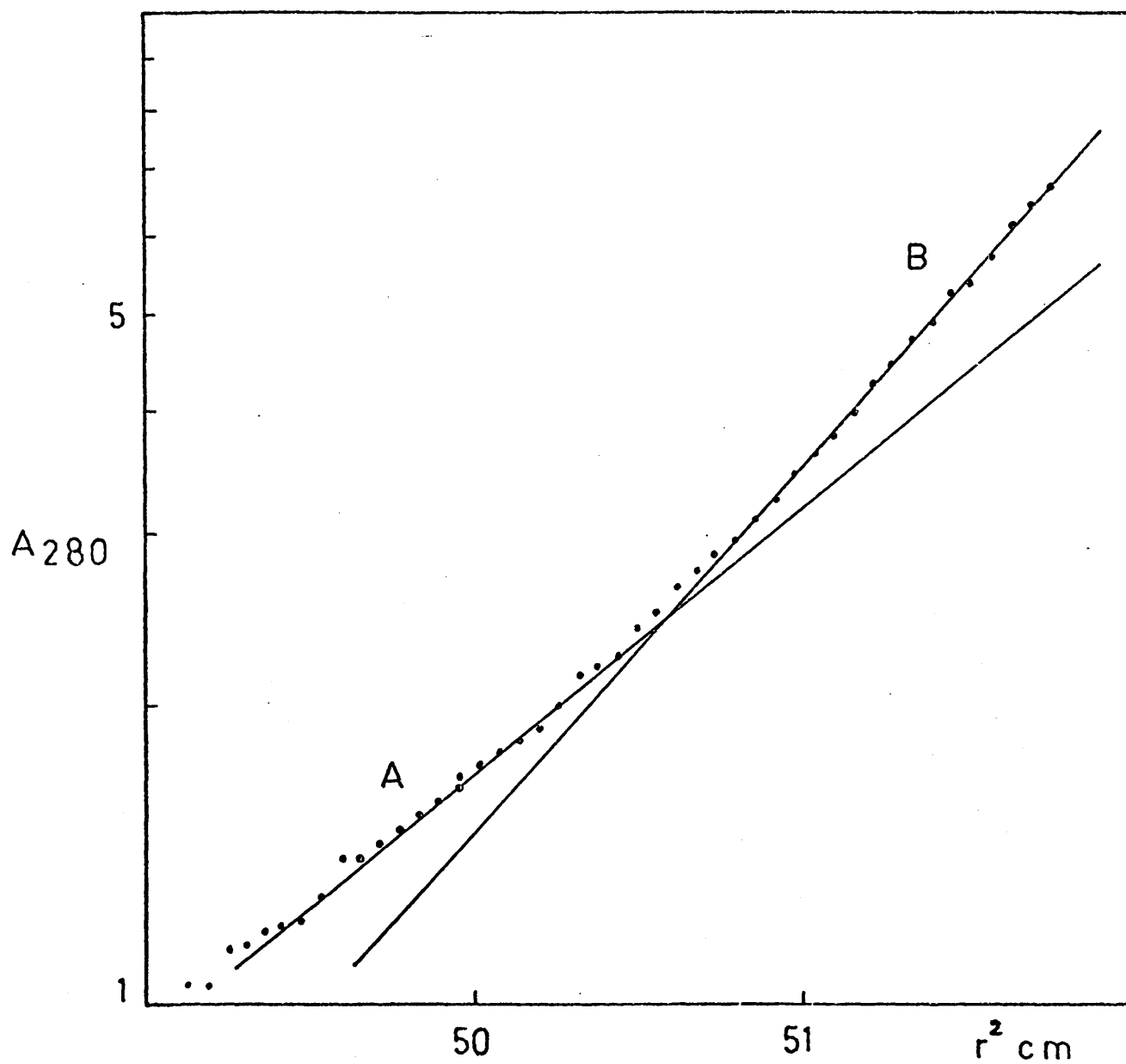


Figura 33.- Equilibrio de sedimentación de BR en 0,1% de SDS
 (20.000 r.p.m., 25,3° C., 72 h., $A_{280} = 0,2$). (Ex-
 plicación de rectas A y B ver texto 3.4.5).

Con el valor de $M_2 = 34.000$ obtenido en 1% de SDS que debe ser la masa molecular mínima posible y el término $M_2 (1 - \phi' \rho_0)$ extrapolado a concentración cero - para la recta de menos pendiente (A), se calculó un $\phi'_{0,1\%} = 0,79$ ml/gr. y aplicando la ecuación (3) se obtuvo para δ_D un valor de 0,17 gr. de SDS/gr. de BR,

Utilizando el método de Goldberg y otros (23) para calcular en un equilibrio de sedimentación de un sistema paucidisperso, la contribución del componente de mayor masa molecular, se restó de la tangente de la recta B el correspondiente valor de la tangente de A, obteniéndose así el término $M_2 (1 - \phi' \rho_0)$ para el segundo componente.

Suponiendo que se tratase de un dímero de BR, su masa molecular sería 68.000, pues bien, con este valor se obtuvo también un volumen específico parcial - efectivo aproximado de BR en 0,1% de SDS de 0,79 ml/gr.

Por último, suponiendo que la recta B correspondiese a un trímero su peso molecular sería 102.000, y el valor del volumen específico parcial efectivo correspondiente resultaría ser 0,86, valor que hay que descartar al ser aún mayor que el medido para la proteína en agua (0,815).

Así pues, aceptando que $\phi'_{0,1\%} = 0,793$ ml/gr. y $\delta_D = 0,17$ se obtuvo un volumen específico parcial de la partícula total BR-SDS, $\bar{v}^*_{0,1\%} = 0,82$ ml/gr. y la ma-

sa molecular de la partícula entera $M_{20,1\% \text{ SDS}}^* = 40.000$.

3.4.5.2. Combinación de medidas hidrodinámicas

Como se vió en 3.4.1. y 3.4.2. $s_{0,1\% \text{ SDS}}^\circ = 2,41\text{S}$, y $D_{0,1\% \text{ SDS}}^\circ = 0,97 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$. Aplicando la ecuación (9) se obtiene para la masa molecular de la proteína no - solvatada un valor de 31.000 y para la partícula total BR-SDS 36.300, ambos inferiores a los calculados por equilibrio de sedimentación de forma análoga a lo que ocurre con 1% de SDS.

3.4.5.3. Dimensiones de la partícula total.

Teniendo en cuenta que $\eta_{0,1\% \text{ SDS}} = 9,266 \times 10^{-3}$ poises, aplicando la ecuación (6) se obtiene $f = 0,48 \cdot 10^{-7}$ y según la ley de Stokes $R_s = 28 \text{ Å}$. El valor del radio mínimo obtenido fue 23 Å y la relación $R_s/R_{\min} = 1,21$, es - decir la partícula posee una forma aproximadamente esférica.

3.4.6. Peso molecular de BR en agua

3.4.6.1. Equilibrio de sedimentación.

Se hizo un experimento de equilibrio de sedimentación a una velocidad de régimen de 7.200 r.p.m. Al cabo de 72 h., los registros mostraban que se había llegado a una situación de equilibrio. Representando A_{280} frente a r^2 , de los registros correspondientes a cada célula se - obtuvieron líneas rectas de cuya pendiente y empleando -

el volumen específico parcial para BR en agua, ($\bar{v}_2 = 0,815 \text{ ml/gr.}$), se calcularon valores de pesos moleculares y mediante un ajuste por mínimos cuadrados de sus inversos frente A_{280} dieron a concentración cero, un peso molecular de 390.000.

3.4.6.2. Combinación de medidas hidrodinámicas

Aplicando la ecuación (9), y utilizando los coeficientes de sedimentación y difusión calculados si multaneamente a una misma muestra se obtuvo en el mismo día y a la misma concentración por este método un peso molecular de 202.000. Considerando que el monómero de BR tiene un peso molecular de 34.000, ello supone que estén agregadas 5,9 moles de BR mientras que con el peso molecular obtenido en 3.4.6.1. el número de agregación es 11,5, es decir aproximadamente el doble. Estos valores son lo suficientemente expresivos por si solos para indicar que en efecto la proteína - tras extraer el SDS permanece en solución, pero en una forma agregada y variable como ya se señaló en sedimentación. En la siguiente tabla, se resumen los resultados obtenidos en el presente trabajo.

TABLA XII

	1% SDS	0,1% SDS	Agua
$s_{25^{\circ}\text{C.}}^{\circ} \text{ (S)}$	$2,1 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,2$
$D_{25^{\circ}\text{C.}}^{\circ} \text{ (cm}^2\text{.sg}^{-1}\text{)}$	$0,66 \times 10^{-6}$	$0,97 \times 10^{-6}$	$0,73 \times 10^{-6}$
$\rho_0 \text{ (gr/ml)}$	1,00235	1,00125	0,99704
$\phi_2' \text{ (ml/gr)}$	$0,752 \pm 10^{-3}$	0,790	-
$\bar{v}_2 \text{ (ml/gr)}$	-	-	$0,815 \pm 10^{-3}$
$\bar{v}^* \text{ (ml/gr)}$	0,833	0,82	-
δD	0,49	0,17	-
M_2	a)	34.000 ± 900	$34.000 - 68.000$
	b)	32.100	31.000
M_2^*	a)	50.700	40.000
	b)	47.800	35.000
$f \text{ (gr/seg)}$	$0,66 \times 10^{-7}$	$0,48 \times 10^{-7}$	-
R_s/R_{\min}	1,35	1,21	-

a) Equilibrio de sedimentación

b) Combinación de medidas hidrodinámicas

El error con que se expresan los resultados experimentales obtenidos, son una expresión de la dispersión de sucesivas medidas.

3.4.7. Discusión

Ha habido varios intentos de determinar la masa molecular de BR, realizados por autores y técnicas diferentes. Los resultados discrepantes entre sí, se recogen en la tabla siguiente:

TABLA XIII

<u>Autores</u>	<u>Técnica</u>	<u>Peso molecular</u>
OESTERHELT y STOECKENIUS (1.971) (1)	Electroforesis en gel poliacrilamida - SDS	26.000 \pm 300
KUSHWAHA y otros (1.975) (2)	Electroforesis en gel poliacrilamida-SDS Velocidad de sedimentación en Gu-HCl	19.000 \pm 800 19.000
KUSHWAHA y STOECKENIUS (1.976) (3)	Electroforesis en gel poliacrilamida-SDS	19.300 \pm 200
BRIDGEN y otros (1.976) (16)	Electroforesis en gel poliacrilamida-SDS Cromatografía Sephadex-SDS Cromatografía Sephadex-Gu-HCl Equilibrio sedimentación 0,1% SDS	19.500 \pm 1.000 20.500 28.000 24.500
Presente trabajo	Electroforesis en gel poliacrilamida-SDS Equilibrio sedimentación 1% SDS Sedimentación-difusión	18.700 \pm 300 34.000 \pm 900 32.000

En primer lugar se observa, la repetición de un valor aproximado de 19.000 para la masa molecular - de BR. Ahora bien este valor siempre se ha obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, y por otro lado siempre que se emplea esta técnica se encuentra este valor si exceptuamos el primer trabajo de Stoeckenius que obtiene un valor más alto para volver a dar 19.000 cinco años más tarde.

Sin embargo a pesar de esta repetición de resultados, es evidente que una o dos de las condiciones necesarias para dar validez a este método empírico no se cumplen en este caso. En primer lugar la proteína - debería de unirse gramo a gramo a la misma cantidad de SDS que las proteínas standard. En segundo lugar que - la relación entre volumen hidrodinámico (expresado normalmente como radio de Stokes) y masa molecular sea - constante para la proteína desconocida y las proteínas standard.

Sorprendentemente las proteínas solubles que se utilizan con más frecuencia como standard fijan aproximadamente la misma cantidad de SDS (1,4 gr/gr. por encima de la c.m.c.) (5) (24) y aumentan en asimetría proporcionalmente a la masa molecular. Hay un número - considerable de polipéptidos que no comparten esta regularidad, especialmente glicoproteínas (25). Este mismo hecho explicaría la dispersión en los valores obte-

nidos para rodopsina bovina (26) y para BR. Bridgen y otros (16) (Tabla XIII) postulan una fijación mayor de lo normal, sin embargo con el volumen específico parcial efectivo que hallan (0,691 ml/gr.) se calcula un máximo δ_D de 1 gr/gr. (para \bar{v}_2 entre 0,732-0,815). El $\delta_D = 0,5$ gr/gr. que nosotros hemos determinado justificaría la menor masa molecular que sistemáticamente se obtiene cuando se emplea la electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS. Tanford (27) determinó los $R_{s,n}$ por viscosimetría de una serie de proteínas en SDS en condiciones en que fijan 1,4 ó 0,4 gr. de SDS por gr. de proteína. Representando estos R_s en función de las masas moleculares de las proteínas en uno y otro caso, se obtienen dos rectas prácticamente paralelas (figura 34).

Por sedimentación, hemos obtenido para BR un R_s de $36,4 \overset{\circ}{\text{Å}}$. La relación entre los R_s medidos por viscosimetría y sedimentación es numéricamente igual a la relación del parámetro β en la ecuación de Mandelkern-Flory(28) con este mismo parámetro para una esfera perfecta no solvatada. Calculando por Scheraga (29), el valor de β para el caso más desfavorable (dentro de las configuraciones probables para BR-SDS), de un elipsoide de revolución prolato con una relación axial de 6-1, obtenemos un $R_{s,n}$ de $39,1 \overset{\circ}{\text{Å}}$.

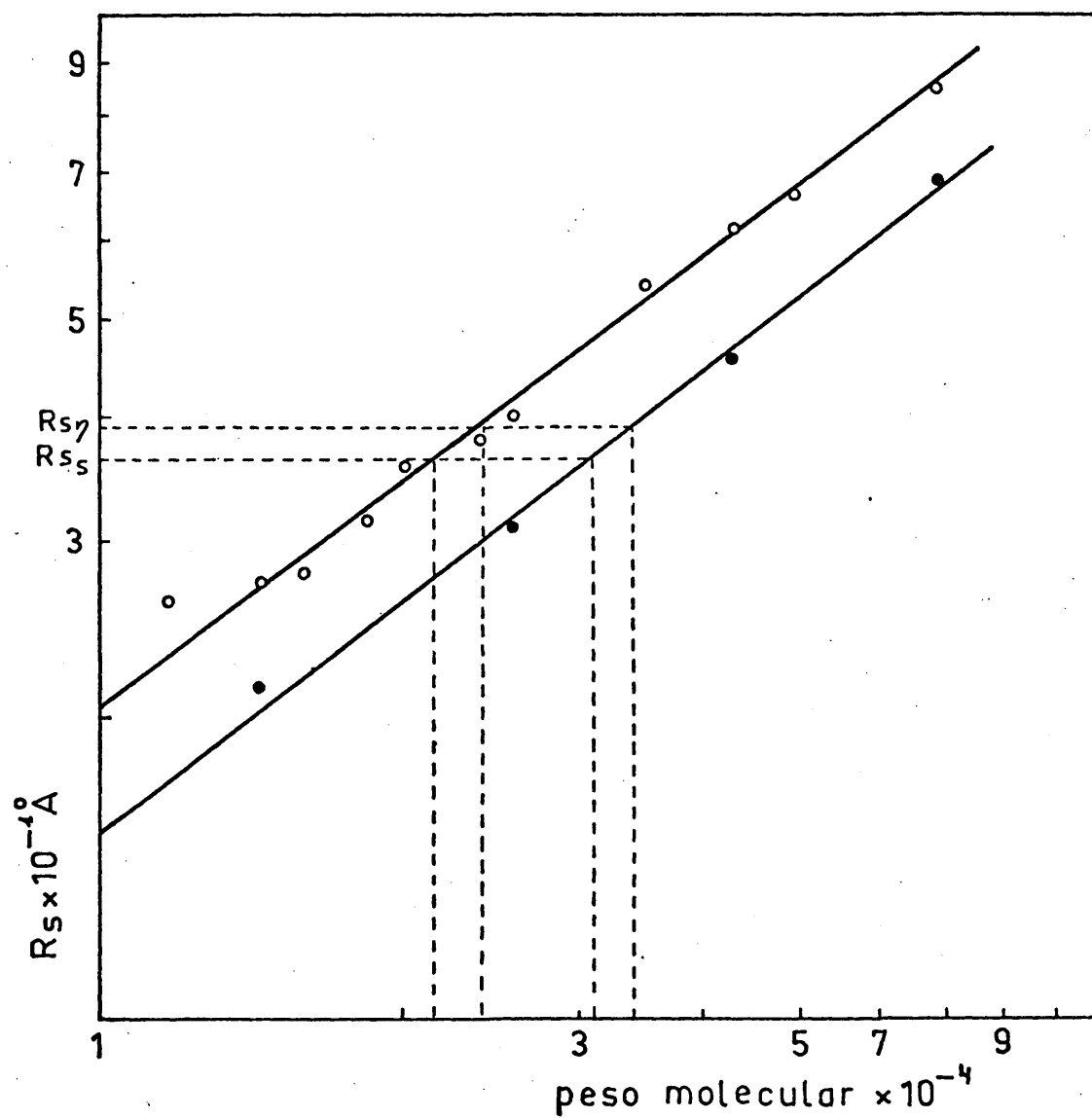


Figura 34.- Radios de Stokes para micelas proteína-SDS, frente al peso molecular de la proteína no solvatada.

$\delta_D = 1,4$ (\circ); $\delta_D = 0,4$ (\bullet).

Interpolando en la gráfica anterior obtenemos pesos moleculares que varían entre 22.000-24.000 y 31.000-34.000, según nos basemos en la recta correspondiente a 1,4 ó 0,4 gr. de SDS por gr. de proteína. Los valores - que hemos determinado para BR en nuestras condiciones, $\delta_D = 0,49$; $R_{s,s} = 36,4 \text{ Å}$ y $M_2 = 34.000$, encajan así en la variación general del R_s con la masa molecular, cuando se unen 0,4 gr. de SDS por gr. de proteína. No sucede lo mismo cuando se comparan con proteínas con $\delta_D = 1,4$, obteniéndose entonces valores bajos confirmando una vez más la necesidad de utilizar como patrones, proteínas que fijen aproximadamente la misma cantidad de detergente que aquella que se desea estudiar.

Por esta misma razón se explicaría los bajos valores obtenidos siempre que se emplean técnicas que - tengan que comparar características del complejo BR-SDS, con las de SDS-proteínas solubles. Esta misma norma debe tenerse en cuenta cuando se trate de otros sistemas de disolventes.

Por ejemplo Kushwaha (2) utiliza el coeficiente de sedimentación de BR en Gu-HCl frente a los coeficientes de sustancias patrón y llega a una masa molecular de 19.000. Pero el coeficiente de sedimentación (18) depende del término $M (1 - \phi_2' \rho_0)$ y el volumen específico efectivo depende a su vez de las interacciones con los componentes del disolvente. Además este método adolece

de la falta de sensibilidad que tiene este coeficiente para variaciones relativamente pequeñas de masas moleculares (30), más aún si varía también la relación masa molecular/coeficiente de fricción y no hay evidencia de que esta relación se mantenga constante en este caso.

Otro tanto ocurre con las determinaciones de masa molecular por cromatografía en gel. Es cierto que las posiciones de elución relativas están determinadas por las dimensiones de la partícula total, pero la relación entre masa de proteína y volumen total dependen de las interacciones con el disolvente, interviniendo también en la posición de elución la mayor o menor asimetría de esta partícula, y si se utiliza detergente - el efecto de éste sobre la misma columna (18) (31). Esto explicaría la discrepancia en los valores encontrados por Bridgen y otros (16) (20.500-28.000) al cambiar de sistema disolvente.

La masa molecular determinada por equilibrio de sedimentación tiene una base teórica rigurosa, pero los resultados dependen de la preparación y tratamiento de la muestra investigada. Bridgen y otros (16) utilizan una muestra de MP tratada con SDS al 2% y dializada frente a 0,1% de SDS, pero en estas condiciones - como hemos visto en 3.2.3., los lípidos de MP quedan - en parte unidos a la proteína. Aunque la justificación

teórica que emplean en la determinación del volumen específico parcial efectivo en estas condiciones (0,691 ml/gr.) es irreprochable (no tanto su determinación experimental pues miden concentraciones sólo por análisis de aminoácidos), nos queda la duda de como afectarán las partículas de lípidos-SDS libres la forma de la curva del gradiente de concentración en equilibrio.

La masa molecular (24.500) obtenida por estos autores contrasta grandemente con nuestro propio valor (34.000) determinado en SDS al 1%, donde es muy difícil pensar en agregaciones que dieran lugar a este aumento. Por combinación de difusión-sedimentación se obtuvo también un valor muy próximo (32.000), que avalla los resultados de los equilibrios de sedimentación. Por otro lado hemos determinado los volúmenes específicos parciales efectivos (0,752) que influyen decisivamente en los valores de masas moleculares en las condiciones más estrictas (concentraciones por peso seco, diluciones por pesada) repitiéndose los resultados con sólo $\pm 0,001$ gr/ml de diferencia.

En el equilibrio de sedimentación realizado en 0,1% de SDS, se evidencia la existencia de agregados (dímeros). Si con la pendiente de la recta atribuible a la especie más pequeña presente (monómero), calculamos ϕ'_2 partiendo de un peso molecular de 24.500, obtenemos un valor de $\delta_D = 1$ gr. Es decir la cantidad

de SDS ligado a la proteína aumenta contra toda lógica al disminuir la concentración. Sin embargo, si calculamos ϕ'_2 basándonos en un peso molecular de 34.000, llegamos a un volumen específico parcial efectivo de 0,79 ml/gr. que correspondería a 0,17 gr. de SDS por gr. de proteína disminución lógica al disminuir la concentración de SDS en el medio. Otro tanto sucede con los valores de los volúmenes específicos parciales efectivos de los dímeros. Se pueden determinar diferencias en la cantidad de SDS ligada a la proteína dentro de los límites aceptables cuando partimos de un peso molecular de 68.000. Todo ello confirma, aunque de una forma indirecta la validez del valor determinado por nosotros.

Todos estos datos nos llevan a confirmar el resultado más importante, una masa molecular de BR de 34.000 ± 900 obtenida en 1% de SDS. Por otro lado la cantidad de SDS por gr. que fija la proteína es mucho menor que la cantidad normalmente unida a otras proteínas, lo que explica los resultados anormalmente bajos que se obtienen por técnicas que comparan comportamiento de BR con otras proteínas.

3.5. CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS DE LYH INCORPORANDO BR, Y DISCUSION DE LOS EFECTOS DERIVADOS DE DICHA INCORPORACION.

Antes de incorporar MP a los liposomas de LYH, precedimos a caracterizar éstos. En la fracción II eluída de la columna de sepharosa 4B (2.1.7.) determinamos coeficientes de sedimentación, viscosidad intrínseca y volumen específico parcial efectivo. Los valores obtenidos (tabla XIV) coinciden con los de Huang y otros (32) con idénticos métodos y condiciones, por tanto aunque no hicimos estudios de microscopía electrónica, consideramos que teníamos una población homogénea de liposomas, es decir, vesículas formadadas por una sola bicapa de fosfolípidos albergando un - compartimento acuoso.

Después, a los liposomas de LYH fuimos incorporando MP a concentraciones crecientes, determinando analíticamente la cantidad de MP incorporada, expresando ésta como una relación LYH/MP (P/P). A cada una de las preparaciones, hicimos idénticas determinaciones que a los liposomas de - LYH · comparando las modificaciones derivadas de la incorporación de BR. Los resultados obtenidos para dichos liposomas con y sin BR incorporada aparecen recopilados en la tabla XIV.

Vemos pues, que la variación del coeficiente de sedimentación ($s^{\circ} = 2 \pm 0,1S$), cae dentro del error experimental de dicho parámetro. La viscosidad intrínseca au-

TABLA XIV

LYH/MP (P/P)					
Inicial	Incorporada	s ^o (S)	{ η } (dl/gr.)	ϕ' (ml/gr.)	δ
-	-	2,1	0,044	0,987	0,77
20/1	7,4/1	1,9	-	0,967	-
10/1	5,5/1	1,9	0,052	0,961	1,12
7/1	4/1	2	0,064	0,957	1,61

menta ligeramente a medida que aumenta la cantidad de BR incorporada a los liposomas, y el volumen específico parcial - efectivo por el contrario disminuye (el valor obtenido en cada caso, es aditivo respecto al correspondiente a los fosfolípidos y MP, y la proporción en que se encuentra en los liposomas).

De acuerdo con Tanford y Buzzell (33), el grado de hidratación (δ) de una partícula hidrodinámica, es decir los gramos de disolvente incorporados por gramo de peso seco, - puede calcularse a partir de la siguiente relación:

$$100\{\eta\} = v(\phi' + \frac{\delta}{\rho_0}) \quad (12)$$

siendo $\{\eta\}$ y ϕ' la viscosidad intrínseca y el volumen específico parcial efectivo de la partícula hidrodinámica y la densidad del disolvente. v es la constante de Einstein-Simha que para esferas es igual a 2,5. Dicho valor (δ) se-

gún vemos en la tabla XIV, aumenta apreciablemente al aumentar la cantidad de BR incorporada a los liposomas, indicando que el tamaño de éstos aumenta ya que este agua en su mayor parte, debe corresponder al comportamiento interno.

3.5.1. Morfología tamaño y forma

En la última preparación de liposomas con BR incorporada (LYH/MP 4/1 (P/P)), realizamos micrografías electrónicas (figura 35). A partir de ellas, calculamos un diámetro de $1.370 \pm 250^{\circ} \text{ \AA}$, cinco veces aproximadamente mayor que el obtenido para liposomas de LYH (32), pero siguen siendo esféricos según se deduce de la micrografía. La dispersión de tamaños es mayor que la de liposomas de LYH (32).

La ley de Stokes, es aplicable a esferas perfectas no solvatadas, y relaciona el coeficiente de fricción de la partícula total, con su radio y la viscosidad del disolvente. A partir del radio medio calculado por microscopía electrónica (605° \AA), y la viscosidad del disolvente en poises (tampón CLK 0,1M, TRIS-0,01M, pH = 8) igual a $8,995 \times 10^{-3}$, se obtuvo para estos liposomas un coeficiente de fricción igual a $1,16 \times 10^{-6} \text{ gr./seg.}$ Dicho coeficiente de fricción, al igual que el de sedimentación se refiere a la partícula hidrodinámica total, pero combinando su valor con el volumen específico parcial efectivo aplicando la ecuación (6), se obtiene la masa molecular de la bicapa excluyendo el compartimento acuoso interior, El valor obtenido fue $3,4 \pm 0,6 \times 10^6$.

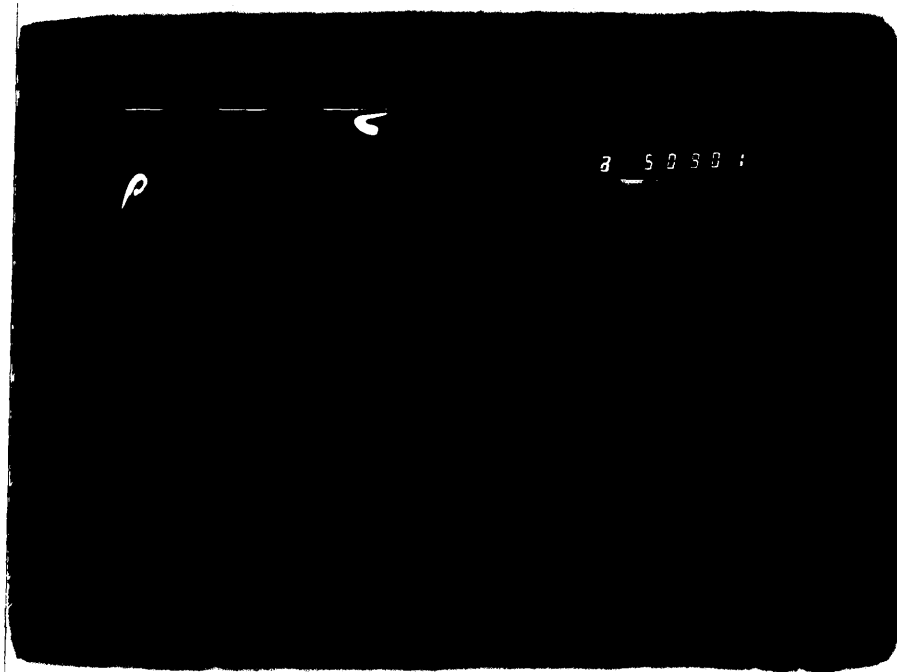


Figura 35.- Micrografía electrónica de liposomas de LYH con BR incorporada. Tinción negativa con molibdato amónico. (50.000 aumentos).

3.5.2. Espectroscopía de absorción y emisión y dicroísmo circular.

El espectro de absorción de liposomas con MP incorporada, muestra que el máximo correspondiente al complejo púrpura (568 nm) se desplaza hacia el azul (15-20 nm). Lo mismo ocurre cuando MP se solubiliza con solventes orgánicos (hexano o decano), es decir, cuando BR se funde en un medio hidrocarbonado, aunque el complejo púrpura no se destruye.

Por espectroscopía de fluorescencia, en liposomas con MP incorporada se observa algo similar a lo que ocurre cuando MP se solubiliza en 1% de SDS, (3.2.1.) es decir el máximo de emisión correspondiente a la proteína se desplaza unos 15 nm hacia el rojo.

La figura 36 A, muestra el espectro de DC en el visible de MP en agua, y de liposomas de LYH con BR incorporada. En MP en agua puede verse la banda bifásica de acoplamiento excitónico, debida a la interacción entre los cromóforos de complejos púrpura de moléculas vecinas en la red hexagonal (34). Por el contrario, en el espectro correspondiente a liposomas, con BR incorporada no existe la banda bifásica, por tanto no hay interacción excitónica, indicando que la estructura cristalina de simetría P_3 ha desaparecido.

La figura 36 B, muestra los espectros de DC en el ultravioleta para MP, liposomas de LYH con BR incorpo

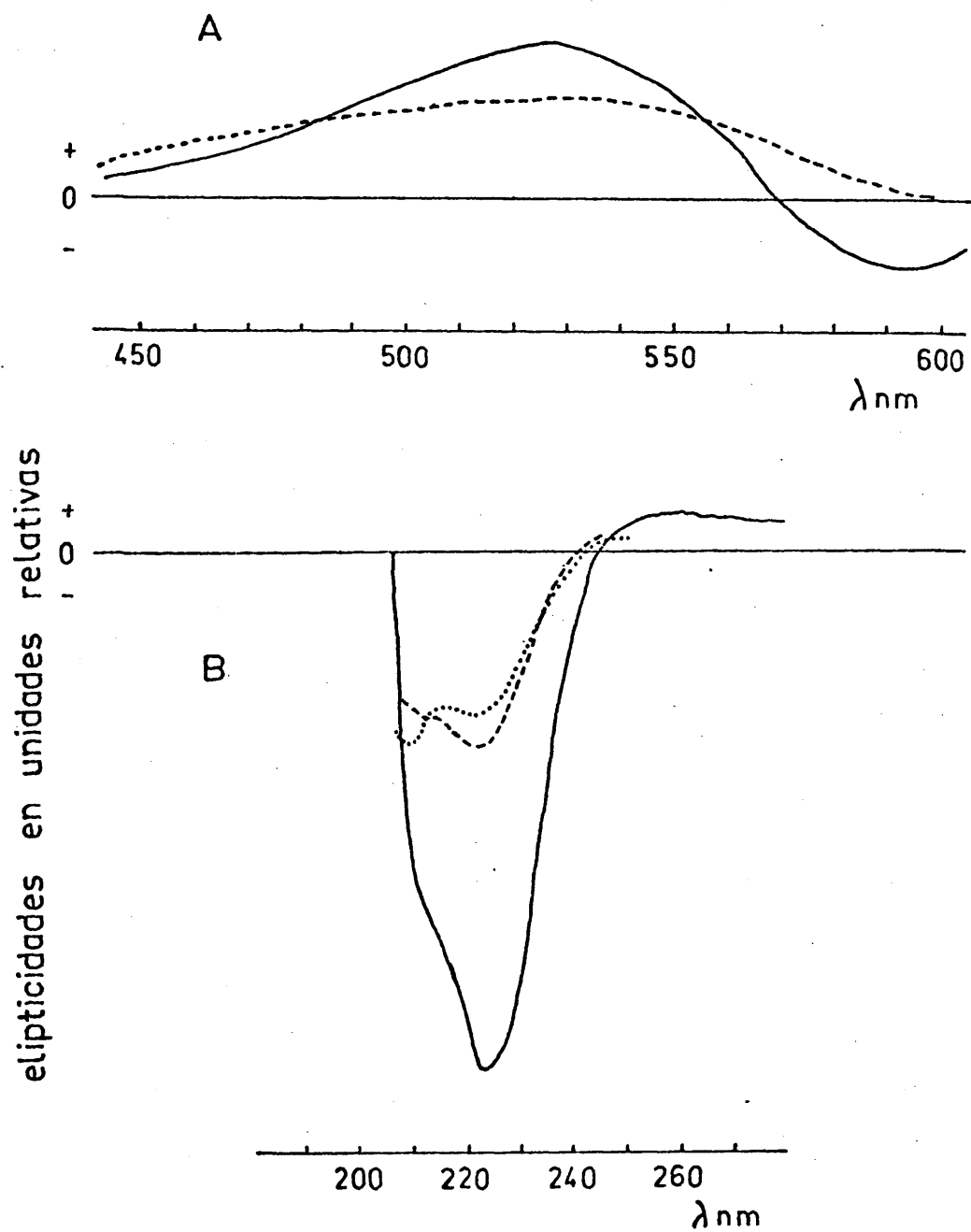


Figura 36.- Espectros de DC. A, MP en agua (—), liposomas de LYH con BR incorporada (---). B, MP en agua (—), liposomas de LYH con BR incorporada (---), y BR en agua (.....).

rada y para BR en agua. En todos ellos se observan los mínimos característicos de α -helices (209-211, y 222 nm) (35), indicando que la estructura de α -hélice existe en BR en todas las condiciones estudiadas; es decir en su membrana natural, incorporada a bicapas artificiales, y aún libre de lípidos en suspensión acuosa.

3.5.3. BR₄₁₂. Vida media, diroísmo lineal.

Efecto de la concentración de ClNa sobre la vida media.

Mediante flash fotólisis, determinamos el tiempo de semi-vida del complejo BR₄₁₂. Las figuras 37 y 38 - muestran las fotografías de las trazas en la pantalla del osciloscopio, para MP en agua y liposomas de LYH con BR incorporada respectivamente. En ambos casos se utilizó un filtro KV 520 Schott, y la temperatura de experimentación fue 22° C. Para MP en agua (concentración 0,7 mg./ml.) la longitud de onda de observación fue 412 nm, y el tiempo de semi-vida calculado $t_{1/2} = 4,5 \pm 0,2$ ms. En liposomas de LYH con BR incorporada (LYH/MP (P/P) 3,4/1) la longitud de onda de observación fue 410 nm y el tiempo de semi-vida obtenido para esta especie transiente de BR fue $t_{1/2} = 25 \pm 3$ ms.

Concentraciones de ClNa {int./ext.} del orden de 1 M no altera apreciablemente el tiempo de desaparición de la especie transitoria BR₄₁₀ en liposomas en relación

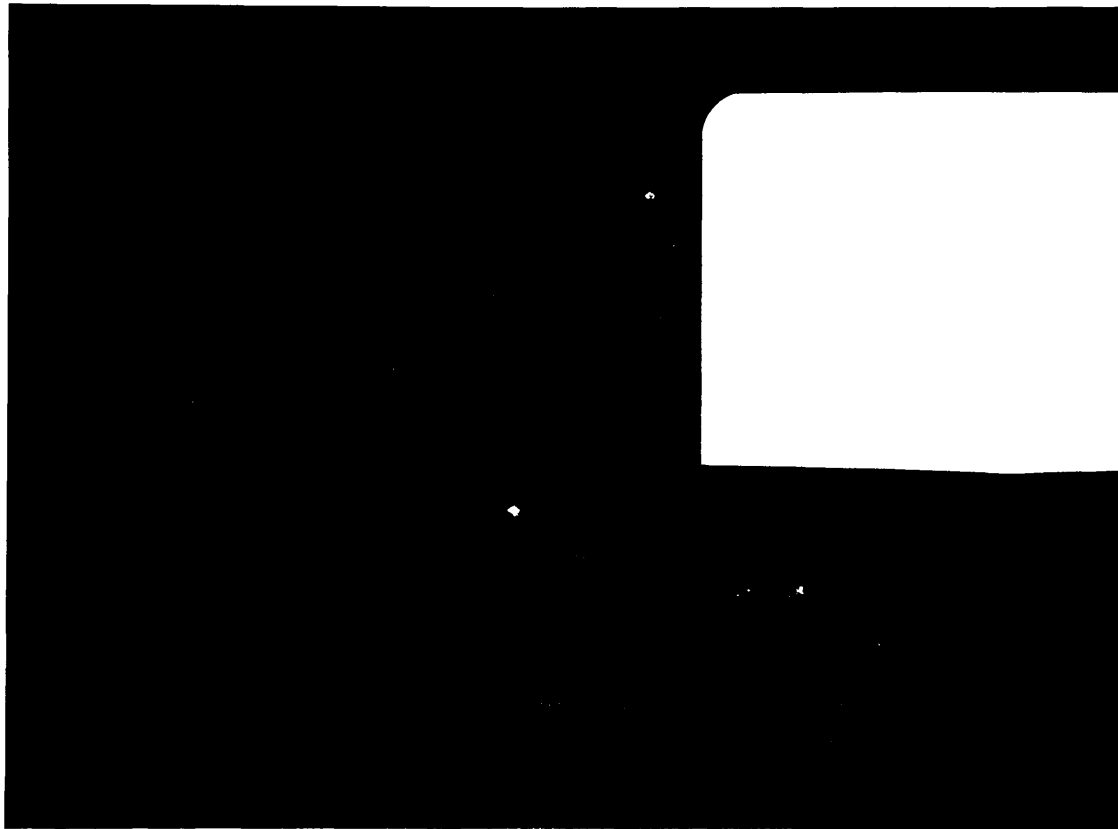


Figura 37.- Decaimiento de BR_{412} en MP en agua. (Eje x, base de
tiempos = 2 ms/división; eje y, 20 mV/división).



Figura 38.- Decaimiento de BR_{412} en liposomas de LYH con BR incorporada. (Eje x, base de tiempos = 10 ms/división; eje y 20 mV/división)

con el tiempo medido en agua destilada (para una relación LYH/MP (P/P) análoga a la anterior, $t_{1/2} = 28,2$ ms.). En este aspecto, el comportamiento de la especie BR_{410} es análogo en la MP y en liposomas, aunque el tiempo de decaimiento en estos últimos, sea unas seis veces mayor.

Los experimentos de fotólisis hechos con luz polarizada linealmente, indican que la orientación inicial en MP de la especie BR_{410} , en liposomas desaparece. Esta desaparición de la polarización se puede relacionar con una mayor libertad de difusión rotacional de las moléculas de proteína en la bicapa liposómica, respecto de la que disponía en la membrana púrpura. Sin embargo, ésta no es la única explicación, ya que, a causa del tamaño calculado de los liposomas el movimiento de rotación de los mismos sería capaz de destruir la polarización inicial (el tiempo de relajación rotacional calculado, empleando un radio igual a 685 \AA , es de 1 ms.). En nuestra opinión la primera posibilidad parece la más probable, ya que los espectros de DC de BR - en liposomas ponen de manifiesto la desaparición de interacciones excitónicas entre los momentos dipolares de transición de los cromóforos. Esto es consistente con una considerable libertad rotacional de las moléculas de proteína en la superficie del liposoma.

Nos queda por comentar, lo que sucede cuando

se someten a flash fotólisis vesículas de H H. y M.M. (membrana marrón). El tiempo de semi-vida calculado - para el complejo BR₄₁₂ en vesículas, es del mismo orden de magnitud que el obtenido para MP en agua (los valores calculados han sido $T_{1/2} = 4-5$ ms.). En suspensiones acuosas de M.M., se calculó el tiempo de semi-vida de aparición del complejo BR₅₆₅, obteniéndose un valor intermedio entre los hallados para liposomas con BR incorporada y MP ($t_{1/2} = 15 \pm 0,8$ ms.). También con M.M. a tiempos largos (mayores de 5 ms.), no se observa dicroísmo lineal. Ello está de acuerdo con Oesterbelt y otros (36), es decir que M.M., no posee estructura cristalina y que las moléculas de BR en dicha membrana, deben tener una mayor libertad de difusión rotacional que en MP.

3.6. DISCUSION GENERAL. MODIFICACIONES AL MODELO ACTUAL DE BACTERIORODOPSINA EN LA MEMBRANA PURPURA.

En la introducción de este trabajo, presenta mos una revisión de la información que sobre la membra na púrpura de Halobacterium halobium y su única proteí na Bacteriorodopsina se tenía en el momento de planifi carlo, así como la que ha ido apareciendo durante el - periodo de su realización. Se puso especial interés en los estudios estructurales de MP y BR, y mostramos el mapa tridimensional de MP obtenido por microscopía - electrónica a una resolución de 7 Å, así como el mode lo propuesto para BR (figura 3 cap. I).

A lo largo del capítulo III, hemos recogido los resultados obtenidos al realizar el plan de trabajo propuesto, así como su discusión, comparando nuestros resultados con los hallados en otros laboratorios, valores que al ser discrepantes pueden modificar o rati ficar los modelos propuestos.

Los estudios de difracción de rayos X y micros copia electrónica de MP (37) (38) (39) (40), como vimos en la introducción de esta tesis, coinciden en una estructura cristalina con ordenamiento hexagonal y un gru po espacial de simetría P_3 , es decir 3 moléculas de pro teína alrededor de un eje ternario perpendicular al pla

no de la membrana. Al determinar el número de moléculas de proteína existentes por celdilla unidad, estos autores utilizan los datos analíticos aportados por Oosterhelt y Stoeckenius (1971) (1) (tabla III), y encuentran discrepancias entre el valor teórico que exige dicha estructura cristalina, y el hallado experimentalmente. - Así en 1.971, Blaurock y Stoeckenius (37), encuentran 3,6 moléculas de proteína por celdilla unidad y aproximadamente 11 moléculas de lípidos por cada molécula de proteína.

Henderson (38) y Blaurock (39), obtuvieron unas dimensiones muy parecidas de la celdilla unidad de MP, y por consiguiente del volumen correspondiente a dicha celdilla (162.000 y 160.000 \AA^3 respectivamente). Henderson a partir de dicho volumen, del peso molecular de BR (26.000) de la relación proteína/lípidos (P/P) ($3/1$), y la densidad de MP ($1,118 \text{ gr/ml.}$) encuentra 3,3 moléculas de proteína por celdilla unidad y 9 moléculas de lípidos por molécula de proteína. Por último, Blaurock, a partir de la composición de aminoácidos calculada por Oosterhelt y Stoeckenius (37) halla un volumen molecular de BR de $32.700 \text{ \AA}^3 + 1,5\%$. Utilizando el volumen específico parcial obtenido también de la composición de aminoácidos ($0,76 \text{ ml/gr.}$), calcula la relación proteína/lípido (V/V), y obtiene 3,4 moléculas de proteína por celdilla unidad y 10 moléculas de lípidos por molécula de proteína.

Vemos pues, que en los tres casos, el número de moléculas de proteína hallado experimentalmente es mayor que el exigido teóricamente, y las relaciones moleculares proteína/lípidos son muy parecidas. Blaurock (39), señala que las discrepancias teóricas y experimentales, pueden salvarse con una mayor relación (P/P) lípidos/proteína o un valor mayor del peso molecular de BR (30.000 sería suficiente).

Los resultados de caracterización química o física de algunas propiedades de MP y BR obtenidos por nosotros se resumen en la tabla III, columna A, y rehaciendo los cálculos de Henderson y Blaurock aplicando dichos datos analíticos obtenemos 3,2 y 3,1 moléculas de proteína por celdilla unidad, valor que aún excede al exigido por la especie de simetría que posee la MP, a pesar de la gran diferencia entre los resultados analíticos obtenidos por nosotros y los resultados obtenidos por Oesterhelt y Stoeckenius (tabla III).

El mapa tridimensional de MP obtenido por Henderson y Unwin (40), y el modelo propuesto por ellos para bacteriorodopsina (figura 3 capítulo I), muestra que existen 7 segmentos de α -hélice de 35-40 Å de longitud, lo cual implica que para un peso molecular de 34.000 de BR, los α -hélices constituyen el 50-60% de la cadena polipeptídica total, valores inferiores al 70-80% calculado por dichos autores, pero mucho más cercano al 45% obteni

do por DC en el ultravioleta (41).

Nosotros encontramos que una parte minoritaria de la cadena polipeptídica de BR en MP, es accesible a la acción de proteasas (3.3). Por medidas de di-croísmo circular, hemos visto que el residuo insoluble de MP no hidrolizado conserva la estructura cristalina, de lo que dedujimos que la parte de la cadena polipeptídica de BR hidrolizable por proteasas, debe quedar fuera de la estructura cristalina de MP. Esta fracción hidrofílica y los acodamientos de los segmentos de α -hélices, deben constituir el 40-50% de la cadena polipeptídica de BR no incluida en los 7 segmentos. Asimismo, dicha fracción minoritaria de BR hidrolizable por proteasas y que no parece estar incluida en la trama cristalina de MP, debe constituir el exceso del número de moléculas de BR por celdilla unidad, que se obtiene, al relacionar, peso molecular (34.000), relación proteína/lípidos (P/P) (7,4/1), densidad de MP en agua (1,2464) y volumen de dicha celdilla unidad (38) (39).

Resumiendo, nosotros encontramos que los resultados obtenidos en este trabajo se ajustan en principio al modelo propuesto para BR en MP, siendo concordantes con los estudios de rayos X y microscopía electrónica, los resultados de proteólisis, peso molecular, relación proteína-lípido (P/P), y densidad de la membrana en agua.

Es obvio, que es necesaria una ulterior deter
minación de la composición de aminoácidos de la bacterio
rodopsina, y del residuo insoluble tras la hidrólisis -
de la membrana púrpura con proteasas, así como realizar
los espectros de DC correspondientes para conocer la pro
porción de α -hélices en uno y otro caso; calcular con -
técnicas rigurosas el peso molecular del residuo insoluu
ble tras la hidrólisis y mediante difracción de rayos X
el volumen de su celdilla unidad. En este momento se co
nocerá, si cuantitativamente encuadran todos los resul-
tados.

3.7. BIBLIOGRAFIA..

- (1) OESTERHELT, D. y STOECKENIUS, W.
Nature New Biology 233, 149 (1.971)
- (2) KUSHWAHA, S.C., KATES, M. y MARTIN, W.G.
Can. J. Biochem. 53, 284 (1.974)
- (3) KUSHWAHA, S.C., KATES, M. y STOECKENIUS, W.
Biochim. Biophys. Acta 426, 703 (1.976)
- (4) HELENIUS, A., FRIES, E. y GAROFF, H. y SIMONS, K.
Biochim. Biophys. Acta 436, 319 (1.976)
- (5) REYNOLDS, J. y TANFORD, CH.
J. Biol. Chem., 245, (19), 5161 (1.970)
- (6) TANFORD, CH.
J. Mol. Biol. 67 59 (1.972)
- (7) RECKER, R., HELENIUS, A. y SIMONS, K.
Biochemistry, 14 (3) 1835 (1.975)
- (8) MOROI, Y., NISHIKIDO, N., VEHARA, H. y NATUURA, R.
Colloid Interface Sci. 50, 255 (1.975)
- (9) HAPPE, M. y OVERATH, P.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 1504 (1.976)
- (10) WILDENAUER, D. y KHORANA, G.H.
Biochim. Biophys. Acta 466, 315 (1977)
- (11) WOLFRAM, B.
Biophys. Struct. Mechanism ., 1, 55 (1.974)
- (12) TRAYHURN, P., MANDEL, P. y VIRMAUX, N.
FEBS. Letters. 38 (3), 351 (1.973)
- (13) TRAYHURN, P., MANDEL, P. y VIRMAUX, N.
Exp. Eye. Res. 19, 259 (1.974)
- (14) BREUGEL, P.J.G.M., DAEMEN, F.J.M. y BONTING, S.L.
Exp. Eye. Res. 21, 315 (1.975)
- (15) POBER, J.S. y STRYER, L.
J. Mol. Biol., 95, 477 (1.975)
- (16) BRIDGEN, J. y WALKER, I.P.
Biochemistry, 15, 972 (1.976)

- (17) OESTERHELT, D. y SCHUHMAM
FEBS Letters, 44, 262 (1.974)
- (18) TANFORD, CH., NOZAKI, Y., REYNOLDS, J.A. Y MAKINO, SH.
Biochemistry, 13, 2369 (1974)
- (19) TANFORD, CH.
"Physical Chemistry of Macromolécules"
John Wiley & Sons. Inc. New York (1.961)
- (20) CRAUBNER, H, KOENIG, F. y SCHMID, G.H.
z. Naturforsch., 30c, 615 (1.975)
- (21) EDSALL, J.T.
Size, shape, and hidration of protein molécules.
The proteins. vol. I. part. B. Academic Press. New
York (1.953) p. 549.
- (22) ROBINSON, N.C. y TANFORD, CH.
Biochemistry, 14, 369 (1.975)
- (23) GOLDBERG, M. y EDELSTEIN, S.
J. Mol. Biol., 46, 431 (1.969)
- (24) TANFORD, CH. REYNOLDS, J.
Biochim. Biophys. Acta, 457, 133 (1976)
- (25) GREFRATH, S. y REYNOLDS, J.A.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3913 (1975)
- (26) FRANK, R. y RODBARD, D.
Arch. Biochem. Biophys., 171, 1 (1.975)
- (27) REYNOLDS, J.A Y TANFORD, CH.
J. Biol. Chem. 245, 5161 (1.970).
- (28) MANDELKERN, L. y FLORY, P.J.
J. Chem. Phys., 20, 212 (1.952)
- (29) SCHERAGA, H.A. y MANDELKERN, L.
J. Amer. Chem. Scan., 75, 179 (1.953)
- (30) TANFORD, CH., KAWAHARA, K. y LAPANJE, S.
J. Am. Chem. Soc. 89, 729 (1.967)
- (31) NOZAKI, Y., SCHECHTER, N.M., REYNOLDS, J.A. y
TANFORD, CH.
Biochemistry, 15, 3884 (1.976)

- (32) HUANG, CH.
Biochemistry, 8, 344 (1.969)
- (33) TANFORD, CH. y BUZZELL, J.C.
J. Phys. Chem., 60, 225 (1.956)
- (34) BAUER, P.J. y DENCHER, N.A.
Biophys. Struct. Mechanism., 2, 79 (1.976)
- (35) CHEN, Y., YANG, J.T. y CHAU, K.H.
Biochemistry, 13, 3350 (1.974)
- (36) SUMPER, M., REITMEIR, H. y OESTERHELT, D.
Angw. Chem. Int. Ed. Engl., 15, 187 (1.976)
- (37) BLAUROCK, A.E. y STOECKENIUS, W.
Nature, New. Biology, 233, 152 (1.971)
- (38) HENDERSON, R.
J. Mol. Biol. 93, 123 (1.975)
- (39) BLAUROCK, A.E.
J. Mol. Biol, 93, 139 (1.975)
- (40) HENDERSON, R. y UNWIN, P.N.T.
Nature, 257, 28 (1.975)
- (41) BECHER, B. y CASSIN, J.V.
Biophys. J., 16, 1183 (1.976)

IV. C O N C L U S I O N E S

Las conclusiones a que llegamos, vistos los resultados anteriormente expuestos, son las siguientes:

1º En el proceso de solubilización de la membrana púrpura con detergentes, todo parece indicar que en primer lugar sucede delipidación y desnaturalización del complejo púrpura y consecuentemente ruptura de la estructura cristalina. La forma monomérica del dodecil sulfato sódico, es quien se une y solubiliza la membrana, consiguiendo por encima de la c.m.c. segregar lípidos y proteína en estructuras micelares independientes.

2º La energía de estabilización de la estructura cristalina de la membrana púrpura es superior a 100 Kcal. por mol de bacteriorodopsina y la contribución de los lípidos es muy pequeña comparada a la de la interacción proteína-proteína.

3º En la membrana púrpura, una parte aparentemente mayoritaria de la proteína no es accesible a la acción de proteasas desde el exterior, y en ella se encuentra el cromóforo base de Schiff retinal-lisina, y todos los aminoácidos aromáticos. El resto de la cadena polipeptídica, es accesible a la acción de proteasas de poca especificidad como son las empleadas en este trabajo, y corresponde a ambas regiones terminales de la proteína.

4º Tras hidrolizar una parte aparentemente minoritaria de la cadena polipeptídica de la bacterioro-

dopsina, se mantiene la estructura cristalina de la membrana púrpura. La papaína digiere fundamentalmente el extremo terminal extracelular, la termolisina por ambos extremos, y la quimotripsina afecta principalmente el extremo citoplasmático.

5º Durante la fotólisis, hay un gran cambio en la estructura de la bacteriorodopsina en la membrana púrpura que al igual que permite el acceso de hidroxilamina hasta la base de Schiff destruyendo el complejo púrpura, permite un mayor ataque con papaína, dejando el residuo insoluble y particulado espectralmente intacto.

6º La masa molecular de la bacteriorodopsina obtenida por equilibrio de sedimentación es de 34.000 ± 900 , - ratificando este valor, el calculado por combinación de medidas hidrodinámicas. En 1% de dodecil sulfato sódico, permanece como monómero semeando un elipsoide prolato con una relación axial 6-1.

7º La bacteriorodopsina, une 0,49 gr. de dodecil sulfato sódico por gr. de proteína, lo que justifica el bajo valor del peso molecular obtenido cuando se la compara por cromatografía y electroforesis en gel con proteínas standard que normalmente unen 1,4 gr. Una vez que se extrae el detergente tras diálisis exhaustiva, la bacteriorodopsina permanece en solución en forma agregada, con un número de agregación variable y dependiente del tiempo. El volumen específico parcial determinado para

la bacteriorodopsina en agua es 0,815 ml./gr., valor muy superior al calculado basándose en su composición de aminoácidos.

8º Los modelos actualmente propuestos para la membrana púrpura y la bacteriorodopsina, por difracción de rayos X y microscopía electrónica, exigen 3 moléculas de proteína por celdilla unidad y por cada molécula de proteína 7 segmentos de α -hélices atravesando perpendicularmente el plano de la membrana. Combinando el volumen de la celdilla unidad y las dimensiones de dichos segmentos de α -hélices con los resultados de este trabajo, se obtienen 3,2 moléculas de bacteriorodopsina por celdilla unidad, y que un 50-60% de la proteína lo constituyen α -hélices. Los acodamientos de los 7 segmentos y la fracción hidrofílica accesible a la acción de las proteasas, deben completar la cadena polipeptídica total de la bacteriorodopsina y justificar el exceso del número de moléculas de proteína calculado por celdilla unidad.

9º La bacteriorodopsina, se incorpora a los liposomas de lecitinas de yema de huevo, aumentando aproximadamente cinco veces el diámetro de éstos. El complejo púrpura no se destruye, pero la estructura cristalina desaparece, aumentando el coeficiente de difusión rotacional de la bacteriorodopsina, y desapareciendo consecuentemente el acoplamiento excitónico entre cromóforos de moléculas vecinas.